

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-37188

(P2000-37188A)

(43)公開日 平成12年2月8日(2000.2.8)

(51)Int.Cl.
C 12 N 15/09
A 61 K 38/45
C 07 K 1/18
7/06
7/08

識別記号

F I
C 12 N 15/00
C 07 K 1/18
7/06
7/08
14/47

マーク(参考)
A

審査請求 有 請求項の数9 O.L (全 57 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平11-139294
(62)分割の表示 特願平5-509840の分割
(22)出願日 平成4年12月7日(1992.12.7)

(31)優先権主張番号 91120974.0
(32)優先日 平成3年12月6日(1991.12.6)
(33)優先権主張国 ヨーロッパ特許庁 (E P)

(31)優先権主張番号 92119551.7
(32)優先日 平成4年11月16日(1992.11.16)
(33)優先権主張国 ヨーロッパ特許庁 (E P)

(71)出願人 594182719
マックス・ブランク-ゲゼルシャフト ツ
ール フェルデルンク デル ヴィッセン
シャフト エー. ファウ.
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 80539
ホーフガルテンシュトラーセ 2
(72)発明者 マンデルコ, エヴァーマリア
ドイツ連邦共和国 2000 ハンブルグ 52
バロン-ヴォートーシュトラーセ 212
エイ.
(74)代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アルツハイマー病の診断および治療用の新規な手段

(57)【要約】

【課題】 アルツハイマータウタンパク質に特徴的なり
ン酸化エピトープ、このリン酸化を特異的に触媒するキ
ナーゼ活性、該キナーゼに対する阻害剤を含有する医薬
組成物、該エピトープを認識する抗体、該エピトープを
含有する診断用組成物、キナーゼおよび/または抗体を
用いるアルツハイマー病のin vitro診断法、正常タウタ
ンパク質のアルツハイマータウタンパク質へのin vitro
変換方法、およびアルツハイマーPHFを溶解したり、
またはその形成を防止するのに効果的な薬剤の試験方法
の提供。

【解決手段】 アルツハイマー病の発症のin vitro診断
法であって、患者の脳脊髄液単離物を検定するか、また
は神経組織の生検を実施して、タウタンパク質の262位
のリン酸化セリン残基の存在について該組織を調べるこ
とからなる方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルツハイマー病の発症のin vitro診断法であって、患者の脳脊髄液単離物を検定するか、または神経組織の生検を実施して、タウタンパク質の262位のリン酸化セリン残基の存在について該組織を調べることからなる方法。

【請求項2】 アルツハイマー病のin vitro診断および/または監視法であって、患者の脳脊髄液単離物を検定するか、または神経組織の生検を実施し、そして

— リン酸化されたアルツハイマータウタンパク質の存在について；

— アミノ酸モチーフのser-pro またはthr-proのリン酸化によってタウタンパク質をアルツハイマータウタンパク質に特異的に変換することができるプロテインキナーゼの存在について；または — ホスファターゼPP 2a、PP 1および/またはカルシニューリンの存在について；該組織を調べることからなる方法。

【請求項3】 前記プロテインキナーゼが次の生化学的性質：

(a) タウタンパク質のser-pro およびthr-proモチーフをリン酸化する；

(b) 42 kDのMr を有する；

(c) ATPにより活性化され、1. 5 mMのK_m を有する；

(d) チロシンのリン酸化により活性化される；

(e) 抗MAPキナーゼ抗体によって認識される；そして

(f) ホスファターゼPP 2aによって非活性化される；を有するものである請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記のプロテインキナーゼが次の工程：

(a) ブタ脳を 10 mMトリス-HCl、pH 7.2、5 mM EGTA 、2 mM DTTおよびプロテアーゼ阻害剤（ロイペプチド、アプロチニン、ペアスタチンA、α 2-マクログロブリン、PMSF）の混合物中でホモジナライズする；

(b) このホモジネートを100,000×g、4℃で30分遠心分離する；

(c) 遠心分離後上清を取り出す；

(d) 硫酸アンモニウム沈殿により粗タンパク質を沈殿させる；(e) 粗調製物をゲル汎過により脱塩する；

(f) 活性化バッファー中のインキュベーションにより粗酵素を活性化する；

(g) 粗調製物をイオン交換クロマトグラフィーによりさらに精製する；そして

(h) ウエスタンプロット法により酵素を同定する；により得ることができる、請求項2に記載の方法。

【請求項5】 前記タウタンパク質のエピトープの組合せを含むポリペプチドは、該組合せはリン酸化されたセリン残基 46, 199, 202, 235, 262, 293, 324, 356, 396, 404および/または422 および/またはリン酸化されたトレオニン残基 50, 69, 111, 153, 175, 181, 205,

212, 217および/または231 を含むものであるが、該組合せは組合せSer199, Ser 202, Ser 235, Ser 404、および/またはThr 205ではないものである請求項2に記載の方法。

【請求項6】 前記タウタンパク質のエピトープの組合せを含むポリペプチドは、次のアミノ酸配列：KESPLQ, YSSPGSP, PGSPGT, YSSPGSPGTPGS, PKSPSS, YKSPVVS, GDTSP RH, MVDSPQL, PLQTPTE, LKESPLQPTED, AKSTPTA, IGDTP SL, KIATPRGA, PAKTPPA, APKTPPS, PAKTPPAPKTPPS, SPG 10 TPGS, RSRTPSL, SLPTPPT, RSRTPSLPTPPT, VVRTPPK, VVR TPPKSPSSA, KIGSTENLK, KCGSKDNIK, KCGSLGNIH、または KIGSLDNITHを有するポリペプチドである請求項2に記載の方法。

【請求項7】 アルツハイマータウタンパク質およびタウタンパク質のセリン残基 262のリン酸化を、請求項5または6に記載のタウタンパク質のエピトープの組合せを含むポリペプチド又は請求項3又は4記載のプロテインキナーゼに対する抗体を使って検出する、請求項2に記載の方法。

【請求項8】 請求項5または6に記載のタウタンパク質のエピトープの組合せを含むポリペプチドを用いることにより、及び/又はこのポリペプチドに対するモノクローナル抗体、又は請求項3又は4記載のプロテインキナーゼに対するモノクローナル抗体を用いることにより、プロテインキナーゼを検出する、請求項2に記載の方法。

【請求項9】 正常タウタンパク質を、該正常タウタンパク質のリン酸化を可能にする条件下において、アミノ酸モチーフのser-pro またはthr-proのリン酸化によってタウタンパク質をアルツハイマータウタンパク質に特異的に変換することができるプロテインキナーゼで処理することからなる、タウタンパク質のアルツハイマータウタンパク質へのin vitro変換法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、アルツハイマーの対になったラセン状フィラメント (paired helical filaments : PHF) からのタウタンパク質中にリン酸化された状態で特異的に存在しているタウタンパク質のエピトープ、タウタンパク質のアミノ酸のリン酸化に関与して該エピトープを生じさせるプロテインキナーゼ、および該エピトープに特異的な抗体に関する。本発明は、また、アルツハイマー病の治療または予防用の医薬組成物、アルツハイマー病の診断用組成物および検出方法、並びに該エピトープを使用することによるアルツハイマータウタンパク質を特異的に検出する抗体の产生に関する。さらに、本発明は、アルツハイマーの対になったラセン状フィラメントを溶解したり、またはその形成を防止するのに効果的な薬剤の試験方法に関する。

3

【従来の技術】アルツハイマー患者の脳には2つの特徴的なタンパク質の沈着物である斑点(plaque)ともつれ(tangle)が存在する。これらの構造物はここ2,3年の間にアルツハイマー病の研究において最も重要になってきている(最近の論文として、Goedert et al., *Current Opinion in Neurobiology* 1 (1991), 441-447を参照されたい)。もつれの主要成分は対になつたラセン状フィラメント(PHF)である。今や、このPHFは微小管結合タンパク質のタウ(通常はニューロンの微小管網状構造に付着しており、特に軸索に豊富に存在している)から主に構成されていることが明らかになっている。

【0003】ヒト脳のタウには、単一の遺伝子の異なるスプライシングから生じる6種類のイソフォーム(isoform)が存在する。これらのイソフォームも全てPHF中に見られる(Goedert et al., *Neuron* 3 (1989), 519-526)。これまでに知られている正常のタウタンパク質とアルツハイマーのPHFタウタンパク質との主な生化学的差異は次のように要約することができる:

(1) PHFタウタンパク質は、正常のタウタンパク質とは対照的に、非常に不溶性であり、このことが生化学的分析を困難にしている;

(2) PHFタウタンパク質はリン酸化に依存する様式である種の抗体と反応し、このことは特別なリン酸化状態を示唆している(Grundke-Iqbali et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986), 4913-4917; Nukina et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 3415-3419);

(3) PHFタウタンパク質はSDSゲル電気泳動において比較的低い移動度を有し、このことはそのリン酸化パターンに関係しうるより高いMr値を示唆している(Steiner et al., *EMBO J.* 9 (1990), 3539-3544);

(4) PHFタウタンパク質は特徴的な78nmの交差反復(crossover repeat)を有するラセン状フィラメントの対を形成している(Crowther and Wischik, *EMBO J.* 4 (1985), 3661-3665)。

【0004】脳から精製されたタウタンパク質はごくわずかな二次構造(CD分光分析により測定)と2.6Sの沈降定数を有して、高度に非対称的な形状を示すが(Cleveland et al., *J. Mol. Biol.* 1161 (1977), 227-247)、これは電子顕微鏡データと一致する(Hirokawa et al., *J. Cell. Biol.* 107 (1988), 1449-1459)。C末端の半分は3または4個の内部反復を含み、これらは微小管結合とそれらのアセンブリーを促進すること(それ故「アセンブリードメイン(assembly domain)」と言う)に関係している。このドメインは数種類のプロテインキナーゼによってリン酸化され(Steiner et al., *EMBO J.* 9 (1990), 3539-3544)、アルツハイマータウの異常なリン酸化を考慮するとこの位置は重要となろう(例えば、Grundke-Iqbali et al., 前掲を参照されたい)。

さらに、この反復領域はアルツハイマーPHFのコア部

分にも存在する(例えば、Goedert et al., 前掲; Jake et al., *EMBO J.* 10 (1991), 2725-2729を参照されたい)。

【0005】PHFタウタンパク質は正常タウタンパク質と比べて微小管に対する親和性が低いと仮定されてきた。そのわけは、正常タウをin vitroでいくつかのキナーゼによりリン酸化すると、同様の効果が見られたからである(Lindwall and Cole, *J. Biol. Chem.* 259 (1984), 5301-5305)。かくして、微小管への結合の欠如または低下はタウタンパク質の異常なリン酸化の結果であるかもしれない。この異常な状態は微小管の崩壊へと導き、迅速な物質輸送といった活動的なニューロンプロセスを妨げるだろう。その後、異常にリン酸化されたタウタンパク質は凝集してPHFを形成するだろう。その結果として、ニューロンが最終的に死んでしまい、かくしてアルツハイマー病が発症することとなる。

【0006】これまで、どのプロテインキナーゼが異常なリン酸化に関与するのか知られていなかった。イシグロら(*Neuroscience Letters* 128, (1991), 195-198)は、セリン/トレオニンプロリンモチーフを認識するプロテインキナーゼを含むウシ脳抽出物からキナーゼ画分を単離した。このキナーゼはタウタンパク質のSer 144, Thr 147, Ser 177 およびSer 315の残基をリン酸化した。これらの残基は他の人達が報告したものとは違っていた(Lee et al., *Science* 251 (1991), 675-678)。従って、どのプロテインキナーゼとどの標的アミノ酸残基がアルツハイマー病の発症に関与しているのか依然として解明されていない。

【0007】さらに、アルツハイマー病の、特に早期段階での診断には、アルツハイマーの症状に特徴的なタンパク質上のエピトープに対する特異的抗体を開発することが最も重要となる。モノクローナル抗体TAU 1が単離されており、これはリン酸化タウタンパク質と非リン酸化タウタンパク質とを識別することができる(例えば、Lee et al., 前掲を参照されたい)。しかし、この抗体はアルツハイマーの症状とは無関係であると思われる脱リン酸化タウタンパク質を特異的に認識する。別の抗体A1z50(Ksiezak-Reding et al., *J. Biol. Chem.* 263 (1988), 7943-7947)はPHFともタウタンパク質とも反応する。Sternbergerら(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985), 4774-4776)は、アルツハイマーのタウタンパク質と神経纖維タンパク質に共通したリン酸化エピトープを認識する抗体SM134を単離した。最後に、Leeら(前掲)は、タウタンパク質のC末端領域中のKSPVモチーフからなるリン酸化ペプチドに対する抗体を製造した。当分野で知られているこれらの抗体は、どれをとって見ても、アルツハイマーの病状にのみ特徴的なエピトープを認識するのかどうか不明であるという欠点をもっている。

【0008】さらに、アルツハイマーの対になつたラセ

ン状フィラメントの微細構造や、タウタンパク質からのそれらの形成の様式または調節に関する信頼できるデータがこれまでに得られていない。タウタンパク質からのPHFの形成様式および該形成の土台となる調節機構が解明されたならば、PHF形成の防止にとって非常に有利であろう。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】かくして、本発明の基礎をなす技術的課題は、アルツハイマー・タウタンパク質に特徴的なリン酸化エピトープ、このリン酸化を特異的に触媒するキナーゼ活性、該キナーゼに対する阻害剤を含有する医薬組成物、該エピトープを認識する抗体、該エピトープを含有する診断用組成物、キナーゼおよび/または抗体を用いるアルツハイマー病のin vitro診断法、正常タウタンパク質のアルツハイマー・タウタンパク質へのin vitro変換方法、およびアルツハイマー・PHFを溶解したり、またはその形成を防止するのに効果的な薬剤の試験方法を提供することであった。

【0010】

【課題を解決するための手段】上記の技術的課題の解明は請求の範囲に記載される態様により達成される。従って、本発明は、アルツハイマーの対になったラセン状フィラメントからのタウタンパク質中にリン酸化された状態で特異的に存在しているタウタンパク質のエピトープに関する。「アルツハイマーの対になったラセン状フィラメントからのタウタンパク質中にリン酸化された状態」という表現は、タウが上方のMrシフトを示し、微小管への結合低下を有し、そしてproがあとに続くserまたはthr、あるいは反復領域内のいくつかのセリンでリン酸化されているタウタンパク質の状態を指す（下記参照）。注：アミノ酸は1文字または3文字表記で表される；例えば、Lehninger, Biochemistry, 第2版、ワースパブリッシャーズ（Worth Publishers）、ニューヨーク、1975年、72頁を参照されたい。

【0011】

【発明の実施の形態】アルツハイマーの対になったラセン状フィラメント中にリン酸化された状態で特異的に存在しているタウタンパク質のエピトープは1つ以上存在している。さらに、これらのエピトープはリン酸化活性を示す单一のまたは異なる酵素によってリン酸化される。

【0012】本発明の好ましい態様において、該エピトープは次の生化学的性質を有する哺乳動物脳由来のアロテインキナーゼによって特異的にリン酸化される：

- (a) それはタウタンパク質中のser-proおよびthr-proモチーフをリン酸化する；
- (b) それは42kDのMrを有する；
- (c) それはATPにより活性化され、1.5mMのK⁺を有する；
- (d) それはチロシンのリン酸化により活性化される；

(e) それは抗MAPキナーゼ抗体によって認識される；そして

(f) それはホスファターゼPP2aによって非活性化される。

【0013】ここで用いる「ser-proおよびthr-proモチーフ」という用語はpro残基があとに続くリン酸化可能なserまたはthr残基を指す。このタイプの部位はMAPキナーゼのイソフォーム、GSK-3およびcdk2によってリン酸化される（下記参照）。

10 【0014】「抗MAPキナーゼ抗体」という用語は、マイトジエン活性化プロテインキナーゼ（MAPキナーゼ）を特異的に認識する抗体を意味する。このキナーゼは、例えばMAP2（微小管結合タンパク質2、例えばde Miguel et al., DNA and Cell Biology 10 (1991), 505-514参照）キナーゼ、MBP（ミエリン塩基性タンパク質）キナーゼまたはERK1（Hunter, Meth. Enzy. 200 (1991), 1-37参照）のような異なる名称で当分野において呼ばれている密接に関連した酵素の1ファミリーに属するだろう。MAPキナーゼはその生化学的性質の点で種々の供給源からの機能的に類似している酵素と似ている（Hunter, 前掲）。

20 【0015】本発明の他の好ましい態様において、前記のエピトープはリン酸化可能なセリン残基46, 199, 202, 235, 396, 404および/または422および/またはリ ン酸化可能なトレオニン残基50, 69, 111, 153, 175, 181, 205, 212, 217および/または231を含む。図1aを参照されたい。アミノ酸の番号付けは最大のヒトタウイソフォーム htau 40と整列させて行った。Goedert et al. (1989, 前掲) を参照されたい。

30 【0016】特に好ましい態様では、前記のエピトープはアミノ酸位置262のリン酸化可能なセリン残基を含む。これは脳抽出物とそれから調製された35kDおよび70kDキナーゼとによってリン酸化される（下記参照）。本発明によると、この残基のリン酸化は微小管へのタウタンパク質の結合を著しく妨げることがわかった。このエピトープはアルツハイマー病の発症を試験するin vitro診断法に使えるかもしれない。

【0017】その他の特に好ましい態様では、このエピトープはリン酸化可能なセリン残基262, 293, 324および409を含む。

40 【0018】従って、本発明の別の目的は、262位のセリンと上記の他のser-proまたはthr-proモチーフのリン酸化状態をアッセイすることによるアルツハイマー病の発症の試験方法を提供することにある。これは、例えば、患者の脳脊髄液のサンプルまたは生検後の神経組織のサンプルを、エピトープに含まれるリン酸化セリン262と非リン酸化セリン262とを識別し得るモノクローナルまたはポリクローナル抗体とインキュベートすることによって行うことができる。

【0019】本発明のエピトープは1つまたはそれ以上

の上で挙げた残基を含むことができる。さらに、本発明のエピトープは1つまたはそれ以上のリン酸化セリン残基、1つまたはそれ以上のリン酸化トレオニン残基、あるいはこれらの組合せを含んでいてもよい。エピトープの実際の組成は当分野で知られた方法によって決定し得る。また、当業者には、タンパク質の他のアミノ酸がMAPキナーゼによってリン酸化されるタウタンパク質の*

KESPLQ, YSSPGSP, PGSPGT, YSSPGSPGTPGS, PKSPSS, YKSPVVS, GDTSPRH, MVDSQL, PLQTPTE, LKESPLQTPTED, AKSTPTA, IGDTPSL, KIATPRGA, PAKTPPA, APKTPPS, PAKTPPAPKTPPS, SPGTPGS, RSRTPSL, SLPTPPT, RSRTPSLPTPPT, VVRTPPK, VVRTPPKSPSSA, KIGSTENLK, KCGSKDNIK, KCGSLGNIH, KIGSLDNITH.

【0022】また、ペアチドの全アミノ酸が抗体によって実際に認識される特定部位に必ずしも関与しないことが理解されるだろう。

【0023】本発明の他の目的は、アミノ酸モチーフのser-pro またはthr-pro のリン酸化によってタウタンパク質をアルツハイマータウタンパク質に特異的に変換することができるプロテインキナーゼを提供することにある。好ましくは、このプロテインキナーゼはMAPキナーゼのクラスに属するものである。これらのキナーゼはいろいろな目的に使うことができ、例えばタウタンパク質のアルツハイマータウタンパク質へのin vitro変換に用いられる。こうして得られるアルツハイマータウタンパク質は、例えばその形成またはPHFの形成を阻止し得る物質の研究に使用できるだろう。さらに、それらはPHFを溶解する薬剤の開発やアルツハイマータウタンパク質の正常タウタンパク質への変換のために使用できるだろう。また、正常タウタンパク質をアルツハイマータウタンパク質へ変換する本発明のプロテインキナーゼの能力に基づいた系はアルツハイマー病の明確なin vitro系を提供すると考えられる。

【0024】本発明の好ましい態様において、このプロテインキナーゼは次の生化学的性質を有する：

(a) それはタウタンパク質中のser-pro およびthr-pro モチーフをリン酸化する；
(b) それは42 kDのMr を有する；
(c) それはATPにより活性化され、1. 5 mMのK⁺を有する；
(d) それはチロシンのリン酸化により活性化される；
(e) それは抗MAPキナーゼ抗体によって認識される；そして
(f) それはホスファターゼPP2aによって非活性化される。

【0025】用語「Mr」はSDSゲル電気泳動により測定された相対的分子量と定義される。

【0026】本発明のさらに別の好ましい態様では、このプロテインキナーゼは次の工程を実施することにより得られる：

*部位に対する抗体により認識されるエピトープに関することも明らかだろう。

【0020】本発明のさらに好ましい態様では、このエピトープは次のアミノ酸配列を含む：

【0021】

【化1】

※ (a) ブタ脳を 10 mMトリス-HCl、pH 7.2、5 mM EGTA、2 mM DTTおよびプロテアーゼ阻害剤(ロイペアチン、アプロチニン、ペアスタチンA、α2-マクログロブリン、PMSF(フッ化フェニルメチルスルホニル))の混合物中でホモジナイズする；

(b) このホモジネートを 100,000×g で30分、4°Cにて遠心分離する；

(c) 遠心分離後上清を取り出す；

(d) 硫酸アンモニウム沈殿により粗タンパク質を沈殿させる；

(e) 粗調製物をゲル汎過により脱塩する；

(f) 活性化バッファー中のインキュベーションにより粗酵素を活性化する；

(g) 粗調製物をイオン交換クロマトグラフィーによりさらに精製する；そして

(h) ウエスタンプロット法により酵素を同定する。

【0027】「活性化バッファー」という用語は 25 mMトリス、2 mM EGTA、2 mM DDT、40 mM p-ニトロフェニルホスフェート、10 μM オカダ酸(okadaic acid)、2 mM MgATP、およびプロテアーゼ阻害剤を含有するバッファーと定義される。

【0028】本発明の他の好ましい態様は、タウタンパク質の反復領域中のIGSおよび/またはCGSモチーフをリン酸化することによりタウタンパク質をアルツハイマータウタンパク質に特異的に変換することができるプロテインキナーゼに関する。

【0029】本発明のキナーゼのさらに好ましい態様において、このキナーゼは次の工程を行うことにより得られる：

(A) 哺乳動物の脳抽出物を Mono Q (Pharmacia社製)でイオン交換クロマトグラフィーにかける；

(B) 溶出画分を微小管への結合およびタンパク質のリン酸化について試験する；

(C) 微小管に結合しかつタウタンパク質をリン酸化し得る画分をゲルクロマトグラフィーによりさらに精製する；

※50 (D) 約35 kDで溶出する画分を Mono Q でイオン交

換クロマトグラフィーにかける：

(E) 200から250 mMのNaCl間で溶出する主ピーカーを集める。

【0030】そして、このキナーゼは次の特徴を有する：

(a) それは Mono Q に結合するが、Mono S には結合しない；

(b) それは酸性 pI を有する；

(c) それは銀染色ゲルで 35 kD に主要バンド (> 9 5%) を、そして 41 kD に小バンド (< 5%) を示す；

(d) それは htau34 に 3.2 Pi の、 htau40 に 3.4 Pi の、 htau23 に 3.3 Pi の、そして変異体 htau23 (Ser262 → Al a) に 2.8 Pi のリン酸量を組み込む；そして

(e) それはタウタンパク質のセリン残基 262, 293, 3 24 および 356 をリン酸化する。

【0031】前記の脳抽出物は例えばヒトまたはウシの脳抽出物でありうる。

【0032】さらに別の好ましい態様において、本発明のキナーゼは次の工程により得られる：

(A) 哺乳動物の脳抽出物の高スピン上清を調製する；

(B) 脳抽出物をイオン交換 Q-セファロース (Pharmac ia 社製) でクロマトグラフィーにかける；

(C) 溶出画分と通り抜け画分をタウタンパク質のリン酸化および微小管結合への影響について試験する；

(D) 通り抜け画分を S-セファロースでクロマトグラフィーにかける (その際、キナーゼ活性は 250 mM NaCl で溶出する)；

(E) ヘパリンアガロースでクロマトグラフィーにかける (その際、キナーゼ活性は 250 mM NaCl で溶出する)；

(F) ゲル汎過にかける (その際、キナーゼ活性は 70 kD で溶出する)；

(G) Mono Q でクロマトグラフィーにかける (その際、キナーゼ活性は 150 mM NaCl で溶出する)。

【0033】そして、このキナーゼは次の特徴を有する：

(a) それは Q-セファロースに結合しないが、S-セファロースには結合する；

(b) それはアルカリ性 pI を有する；

(c) それは SDS ゲルで 70 kD 付近に主要バンドを示す；

(d) それは htau34, htau40, htau23 および構築物 K 1 9 (すなわち、4 反復微小管結合領域) に 3~4 個のリン酸を組み込む；

(e) それは K 1 9 の変異体 (Ser 262, 293, 324 および 356 が Ala に変更されている) をリン酸化しない；そして

(f) それはタウタンパク質の Ser 262, 293, 324 および 356 をリン酸化する。

【0034】本発明の別の好ましい態様において、タウタンパク質の 2 つの IGS モチーフと 2 つの CGS モチーフ (Ser 262, 293, 324, 356) をリン酸化する 70 kD キナーゼは次の工程により得られる：

(A) 脳抽出物の高スピン上清を調製する；

(B) Q-セファロースでクロマトグラフィーにかける；

(C) 通り抜け画分を S-セファロースでクロマトグラフィーにかける (その際、キナーゼ活性は 250 mM NaCl で溶出する)；

(D) ヘパリンアガロースでクロマトグラフィーにかける (その際、キナーゼ活性は 250 mM NaCl で溶出する)；

(E) ゲル汎過にかける (その際、キナーゼ活性は 70 kD で溶出する)；

(F) Mono Q でクロマトグラフィーにかける (その際、キナーゼ活性は 150 mM NaCl で溶出する)。

(図 45 参照) 工程 A の脳抽出物は例えばヒトまたは他の哺乳動物の脳抽出物であり得る。上記の精製工程は本

20 明細書に記載されるような当業界で知られた慣用工程であり、かくして脳抽出物の調製は実施例 1 に記載するところに行い、一方タウとタキソール安定化微小管との間の結合実験は実施例 (6) に記載するように行うことができる。

【0035】さらに、インゲル (in-gel) アッセイのよ うなタウ-リン酸化のアッセイは実施例 1 に詳述するように行うことができる。

【0036】Mono Q でのクロマトグラフィーは実施例 1 に記載するように行うことができる。

【0037】該キナーゼを得るために採用した実際の条件に関して、当業者は上に既説したプロトコールから逸脱しても本発明のキナーゼを得ることができるだろう。かかる逸脱は、例えば工程 (a) のアロテアーゼ阻害剤混合物の組成に関係する。すなわち、キナーゼ活性が低下または破壊されないという条件で、異なる阻害剤を使用することができる。

【0038】最も好ましい態様において、本発明は、タウタンパク質のセリン残基 46, 199, 202, 235, 262, 3 96, 404, 422 およびトレオニン残基 50, 69, 111, 153,

40 175, 181, 205, 212, 217, 231 を特異的にリン酸化するプロテインキナーゼに関する。

【0039】他の最も好ましい態様では、該キナーゼはセリン残基 262 をリン酸化する。

【0040】さらに好ましい態様はグリコーゲンシンターゼキナーゼ-3、すなわちイソフォーム α (51 kD) または β (45 kD) および/または cdk2-サイクリン A (33 kD) であるプロテインキナーゼに関する。

【0041】本発明の別の好ましい態様において、該キナーゼはヒト脳、ブタ脳または他の供給源に由来するア

ロテインキナーゼである。

【0042】本発明の他の目的は、本発明キナーゼの特異的阻害剤を、場合により製剤上許容される担体および／または希釈剤と共に含有する医薬組成物を提供することにある。

【0043】「プロテインキナーゼの特異的阻害剤」という用語は、本発明のプロテインキナーゼの酵素作用を特異的に阻害する物質を指す。プロテインキナーゼのような酵素の阻害剤およびそれらの作用機序は当分野でよく知られている。例えば、このような阻害剤は酵素の触媒ドメインに結合し、そのため酵素はその基質を変換できなくなってしまう。かかる阻害剤の例はペプチド阻害剤およびPP2aのような非活性化ホスファターゼである。その他の例はホスファターゼ（例えばMAPキナーゼの場合のPP-2a）によるキナーゼの非活性化である。医薬組成物は、それを必要とする患者に、その症例に精通している医師が適当と考える経路および用量で投与されるだろう。製剤上許容される担体および／または希釈剤は当分野で公知であり、投与経路または患者の特定の症状に応じて処方される。

【0044】好ましい態様において、本発明はアルツハイマー病の治療用医薬組成物に関する。また、この医薬組成物は該症例を取り扱う医師が適当と考える経路および用量でそれを必要とする患者に投与される。

【0045】本発明の他の好ましい態様において、医薬組成物は特異的阻害剤として本発明のエピトープを含むオリゴーまたはポリペプチドを少なくとも1種含有する。「本発明のエピトープを含むオリゴーまたはポリペプチド」という用語は、対応する抗体によって特異的に認識される本発明のエピトープをその二次元または三次元構造において再構成するペプチドを意味する。さらに、該オリゴーまたはポリペプチドは該エピトープを提示するアミノ酸のみから成っていても、追加のアミノ酸を含んでいてもよい。このようなオリゴーまたはポリペプチドの構築は当分野で公知である。

【0046】本発明の他の目的は、本発明のエピトープを特異的に認識する抗体である。この抗体は血清に由来するものであっても、モノクローナル抗体であってもよい。所望のエピトープに対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体の生産は当分野で公知である（例えば、Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988を参照されたい）。さらに、抗体は天然のものであっても、当分野で十分に理解されている技術により誘導されるキメラ抗体のような遺伝子工学的手法により得られた抗体であってもよい。さらに、抗体はFabフラグメントのような特定のエピトープに結合する能力を保持している抗体のフラグメントであってもよい。

【0047】好ましい態様において、本発明の抗体は本発明のプロテインキナーゼを認識する。ここで用いる

「本発明のプロテインキナーゼを認識する」という用語は、該抗体が同じ生物学的環境に存在する異なるプロテインキナーゼのような他の物質と交差反応しないか、または有意には交差反応しないことを意味する。さらに、それは該抗体がin vitro系で試験するとき異なるプロテインキナーゼと交差反応しないか、または有意には交差反応しないことを意味する。

【0048】別の好ましい態様において、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。

10 【0049】本発明のその他の目的は、アルツハイマー病を検出および／または監視するための診断用組成物を提供することにあり、該組成物は

- 本発明のエピトープ；
- 本発明のキナーゼ；および／または
- 本発明の抗体；

を含有する。

【0050】本発明の診断用組成物は、例えば試験サンプル中の本発明キナーゼの1種または高レベルの該キナーゼを特異的に認識する本発明の抗体を含有しうる。別の態様では、診断用組成物は本発明のエピトープの1つに対する本発明の抗体を含有しうる。かくして、本発明のエピトープを認識する抗体でサンプルを処理することによりサンプルのアルツハイマーに関連した病状を検出することができる。抗体-エピトープ（ハプテン）複合体は、当分野で知られた方法により標識された本発明抗体に対する第2抗体を用いて視覚化しうる（例えば、Harlow and Lane, 前掲を参照されたい）。本発明のさらに別の態様において、診断用組成物は本発明のエピトープと本発明の抗体から構成されていてもよい。基準サンプルとして用いられる本発明エピトープへの該抗体の結合

20 に関連してサンプルへの該抗体の結合が生じる場合、該抗体でサンプルを処理することにより対応する患者の病状について診断をくだすことができるだろう。さらに別の態様では、診断用組成物は本発明のエピトープ、本発明のキナーゼ、それに本発明の抗体を含有する。本発明エピトープのリン酸化と対比してサンプルのリン酸化に関してキナーゼ活性をモニターすることができる。定量されたキナーゼ活性から、サンプル中に含まれるタウタンパク質のリン酸化状態を知り、それから患者の病状を推定することができる。キナーゼ活性は、例えば同一反応中に基質類似体（酵素的変換の際に肉眼で検出可能なもの）を加えることによって推定しうる。このような基質類似体は当分野で広く用いられている。これとは別に、本発明のキナーゼで処理した後に、リン酸化エピトープに対する本発明抗体を利用して内部標準として診断用組成物により提供される抗体-エピトープ複合体の量を使用することにより、あるいはキナーゼによってタウタンパク質に組み込まれたリン酸の量を、例えば当分野で公知の放射性トレーサー法を使って測定することに

40 40 より、サンプル中のリン酸化タウタンパク質の量を検出

することができる。当業者は本発明の上記物質を適宜に組み合わせた他の試験系をデザインする立場にある。考えうる全ての組合せは本発明の保護の範囲内に含まれることを理解すべきである。

【0051】本発明の他の目的はアルツハイマー病を診断および/または監視するためのin vitro法を提供することにあり、該方法は

- 本発明のエピトープを含むリン酸化されたアルツハイマー^{タウ}タンパク質の存在について；

- 本発明のプロテインキナーゼの存在について；

- ホスファターゼPP2a、PP1および/またはカルシニューリン(calcineurin)の存在について；

患者の脳脊髄液単離物を検定するか、あるいは神経組織の生検を実施することから成っている。「患者の脳脊髄液単離物」は標準医学的手法により得られる。

【0052】生検に適する神経組織の例は嗅上皮である。当業者は、例えば上記の診断用組成物に関連して示した診断手段(tool)を用いてこの方法を実施することができる。

【0053】本発明の好ましい方法では、アルツハイマー^{タウ}タンパク質およびタウタンパク質のセリン残基262のリン酸化が本発明の抗体を用いて検出される。この抗体は本発明のエピトープに対する抗体であることが好ましい。

【0054】本発明の別の好ましい態様において、プロテインキナーゼは本発明のエピトープを含むオリゴーまたはポリペプチドを用いて、および/または本発明の抗体を用いて検出される。

【0055】本発明のさらに他の目的は、正常タウタンパク質のリン酸化を可能にする条件下で正常タウタンパク質を本発明のプロテインキナーゼで処理することからなる、正常タウタンパク質をアルツハイマー^{タウ}タンパク質に変換するためのin vitro法を提供することにある。「アルツハイマー^{タウ}タンパク質」という用語は、異常にリン酸化されており（例えば、ser-proまたはthr-proモチーフで）かつアルツハイマー特異的抗体により認識されるタウタンパク質を指す。

【0056】「正常タウタンパク質のリン酸化を可能にする条件」という用語は、プロテインキナーゼの活性、好ましくは最適活性を可能にする条件を指す。この活性はser-proおよび/またはthr-proモチーフでの基質のリン酸化をもたらす。その後、リン酸化された基質はアルツハイマー特異的抗体により認識される。

【0057】正常のタウタンパク質は天然または組換え源から得られる。しかしながら、本発明の方法を実施するためには組換え物質を使用することが有利である。本発明の方法は様々な目的のために十分量のアルツハイマー^{タウ}タンパク質を提供する。つまり、本発明の方法を用いると、アルツハイマー状態のタンパク質の生成を研究するためのin vitroモデルが確立される（上記参

照）。さらに、正常^{タウ}タンパク質のアルツハイマー^{タウ}タンパク質への変換を阻止する阻害剤についても試験することができる。これらの「阻害剤」は、例えばエピトープをブロックすることによりリン酸化されるエピトープに特異的であるか、または、それらがプロテインキナーゼの生物学的活性を妨害するという条件でプロテインキナーゼの種々のドメインに向けられたものであり得る。他のタイプの阻害はタウまたはそのキナーゼに対するホスファターゼの拮抗作用である。さらに、本発明の方法により生成されたアルツハイマー^{タウ}タンパク質は微小管構造への結合実験にも使うことができ、かくしてアルツハイマー病の根底にある分子レベルの解明に貢献するだろう。当業者は様々な目的のために本発明の方法を如何に利用するかについて理解しており、これらは全て本発明の保護の範囲内に入るものである。

【0058】本発明は、さらに、本発明のエピトープを用いてアルツハイマー^{タウ}タンパク質に特異的な抗体、またはアルツハイマー病の発症に特有なタウタンパク質に対する抗体を産生することに関する。この抗体を得る

ための方法は当分野で公知であり、標準方法を使ってボリクローナルまたはモノクローナル抗体をつくることができる（例えば、Harlow and Lane, 前掲を参照されたい）。抗体産生のためにオリゴーまたはポリペプチドを用いる場合は、該エピトープへの免疫反応を引き出し、あるいは増強しうる適当なキャリアー分子（例えば、ウシ血清アルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニン）にエピトープ含有ペプチドを結合させることが望ましい。ハプテン（エピトープを含むか、それと同一である）とキャリアーとの結合方法も当分野で公知である（Harlow and Lane, 前掲）。また、所望の抗体を産生させるのに適した動物もこのために使用しうることを理解すべきである。

【0059】その他の面において、本発明は、タウタンパク質二量体からのアルツハイマーの対になったラセン状フィラメントの生成を阻止する阻害剤を含有するアルツハイマー病の治療または予防用の医薬組成物に関する。

【0060】本発明によると、タウタンパク質はそのC末端ドメインに存在する反復単位の集合（アセンブリー）によりアンチパラレル二量体を形成することがわかった。タウタンパク質の二量体化は生理学的プロセスであるようだが、PHFのような高次構造の形成はアセンブリー過程での規制解除によるものと考えられる。その結果として、多数のタウ二量体からPHFが形成され、その際の二量体の架橋は分子間ジスルフィド結合を介して起こる。

【0061】アセンブリー過程の規制解除とそれに続くタウ二量体からのPHFの形成はタウタンパク質の異常なリン酸化によると思われる。その理由は、本発明により判明したことだが、反復単位だけからなる末端切断型

のタウタンパク質はPHFを形成する能力があるのに対して、N末端およびC末端からなるタウタンパク質またはタウ様タンパク質はその能力がないからである。

【0062】それ故、本発明の組成物において有用な阻害剤は、それが妨害する分子機構とは無関係に、タウ二量体からのPHFの形成を阻止しうる阻害剤である。かかる阻害剤は、例えばタウ二量体の分子間架橋の形成または会合を妨げる化合物としての、タウタンパク質の異常なリン酸化に関与するプロテインキナーゼの阻害剤でありうる。

【0063】本発明の更なる目的は、アルツハイマーの対になったラセン状フィラメントを溶解するのに効果的な薬剤の試験方法を提供することにあり、この方法は次の工程を含んでいる：

(a) タウ由来の配列を含むポリペプチドから適当な条件下でアルツハイマー-PHF (対になったラセン状フィラメント) を形成させる；

(b) アルツハイマー-PHF を試験すべき薬剤とインキュベートする；そして

(c) アルツハイマー様PHFの溶解に関する工程

(b) のインキュベーションの結果を検討する。

【0064】ここで用いる「アルツハイマーの対になったラセン状フィラメントを溶解するのに効果的」という用語は部分的に溶解されたPHFをも含むものである。本発明の目的のためには、試験される薬剤はPHFの退縮または分解に効果的で、治療において補助的役割を果たすだけで十分であるが、薬剤によるPHFの全溶解が好ましい。

【0065】「タウ由来の配列を含むポリペプチド」という用語は、該配列の長さ、または突然変異、欠失、挿入にかかわりなくPHFを形成することができるタウタンパク質由来の配列、あるいは該ポリペプチドのPHF形成能が完全なままであるという条件で異種配列を含むポリペプチドを指す。

【0066】アルツハイマー-PHFの形成に関する用語「適当な条件」とはPHFの形成を可能にする条件のことである。該条件は、天然のタウタンパク質を用いる場合にはMAPキナーゼの利用可能性を含む。

【0067】好ましい態様において、上記方法の工程

(a) に適用される条件は0.3~0.5Mのトリス-HC1、pH5.0~5.5で、追加の塩類を含まない環境である。

【0068】本発明のさらに他の目的は、アルツハイマー-PHFの形成を防止または軽減するのに効果的な薬剤の試験方法を提供することにあり、この方法は次の工程を含んでいる：

(a) 試験すべき薬剤とタウ由来の配列を含むポリペプチドとを該薬剤の非存在下でアルツハイマー-PHFの形成を可能にする条件下でインキュベートする；そして

(b) インキュベーション混合物中のアルツハイマー-P

HFの有無について工程 (a) インキュベーションの結果を検討する。

【0069】「該薬剤の非存在下でアルツハイマー-PHFの形成を可能にする条件」という用語は、該薬剤がインキュベーション混合物中に含まれないという前提のもとにPHFの形成を可能にする条件を意味する。かかる条件の好ましい例は0.3~0.5Mのトリス-HC1、pH5.0~5.5で、追加の塩類を含まない環境である。

10 【0070】ここで用いる「アルツハイマー-PHFの有無」という用語は、該薬剤を使用しなかった対照実験と比べて、ほんの限られた量のPHFが形成された場合の結果をも含めるものとする。

【0071】上記方法の好ましい態様において、該ポリペプチドは本質的にタウタンパク質のC末端部分からの反復単位を含む。

【0072】本発明によると、タウタンパク質のC末端ドメインに含まれる反復単位は、生理学的条件下での該タンパク質の二量体化と、その後のアルツハイマー様PHFをもたらすオリゴマー化に関与していることがわかった。用語「アルツハイマー様PHF」はここでは、PHF中に通常存在するタウタンパク質の非反復単位部分が該ポリペプチドにより生成されたPHFには無いことを単に示すために、「アルツハイマー-PHF」に対立するものとして用いられる。

【0073】従って、本質的に反復単位のみを含むポリペプチドはPHFの形成とPHFの微細構造を研究するための理想的なin vitro系を提供する。

30 【0074】特に好ましい態様において、該ポリペプチドは主にK11および/またはK12のようなタウの反復領域から成っている。

【0075】K11およびK12は、本質的にタウタンパク質のみに由来する反復単位から成るので、上記の試験目的には理想的に適っている。本発明の方法では、K11およびK12を単独で使用しても、組み合わせて使用してもよい。

【0076】更なる面において、本発明はアルツハイマー-PHFを溶解するのに効果的な薬剤の試験方法に関し、該方法は次の工程を含んでいる：

40 (a) タウタンパク質を発現または過剰発現する細胞に、適当な調節領域の制御下にあるMAPキナーゼをコードする機能遺伝子を導入する；

(b) リン酸化タウタンパク質を形成させ、そしてアルツハイマー-PHFを形成させる；

(c) 該アルツハイマー-PHFを単離する；

(d) 試験すべき薬剤を該PHFに適当な条件下で加える；そして

(e) 該PHFに及ぼす該薬剤の効果を調べる。

【0077】上記の工程 (a) で用いる「タウタンパク質を発現する細胞」という用語は、タウを内因的に発現

する細胞または機能タウ遺伝子が導入されていてタウを発現する能力を有する細胞を指す。後者の場合、当業者は、MAPキナーゼをコードする遺伝子とタウをコードする遺伝子の導入順序が本発明方法の目的にとって意味のあるものではないことに気づくであろう。

【0078】上記の工程(d)における用語「適当な条件下」とは、PHFを溶解するのに該薬剤を効果的にさせる条件のことであり、特に最適条件を指す。

【0079】この方法は、in vitro状況の類似したイメージを提示する連続増殖細胞系の使用を土台にした系がリン酸化タウタンパク質の十分な供給量を提供するので、特に有利である。

【0080】好ましい態様では、タウタンパク質を発現する細胞は神経芽細胞腫または有色細胞腫の細胞もしくは神経細胞の一次培養物である。かかる細胞または細胞系は当分野で公知である。好ましい例は神経芽細胞腫の細胞系N21およびPC12である。

【0081】これらの細胞系はタウを内因的に発現するので特に好適である。

【0082】本発明の更なる目的は、有効成分としてまたは有効成分の1つとしてPP2aおよび/またはPP-1および/またはカルシニューリンホスファターゼを含有するアルツハイマー病の治療用医薬組成物である。

【0083】図は下記のものを示す。

図1a: タウのアミノ酸配列(イソフォームhtau40, Goedertら, 1989)。SP, TP, IGS及びCGSのモチーフは目立つように印を付けてある。

図1b: (a)はタウイソフォームのSDSゲルで、(b)は(a)及びPHFタウのAT8抗体を用いたイムノプロットである。

(a) SDSゲル。レーン1はマーカータンパク質である。レーン2はウシ脳由来のタウで、リン酸化の程度が様々な数個のイソフォームを示している。レーン3はアルカリホスファターゼで脱リン酸化した後のウシ脳タウである。すべてのイソフォームが、より低いMrにシフトしていることに注目されたい。レーン4及び5は、脱リン酸化前及び後の正常なヒト脳のタウである。レーン6~11は、細菌によって発現させたヒトタウイソフォームhtau23, 24, 37, 34, 39, 及び40(Goedertら, 1989, 同頁参照)である。これらのイソフォームは、それぞれC末端側半分に存在する31個のアミノ酸残基からなる内部反復単位を3つまたは4つ含む(3つ: htau23, 37, 39; 4つ: htau24, 34, 40)。N末端付近には、29個のアミノ酸残基からなる挿入配列が0、1つまたは2つ存在し得る(0: htau23, 24; 1つ: htau37, 34; 2つ: htau39, 40)。

(b) AT8抗体を用いたイムノプロット。レーン1はPHFタウで、60~70kDの範囲に4~6個のイソフォームを示している。これらのイソフォームはすべて

AT8に対して強く反応する。レーン2~11は(a)で用いたのと同じ調製物である。ウシのタウイソフォームも、正常なヒトのそれも全く反応を示していない。

図2: 細菌によって発現させたヒトタウの、脳のキナーゼを用いたリン酸化。(a)はSDSゲルで、(b)はAT8を用いたイムノプロットである。

(a) レーン1及び2はhtau23の、抽出物リン酸化前及び後のSDSゲルである(Mrの上向きシフトに注意)。レーン3~10は他のイソフォーム(htau24, 34, 39, 40)の類似ペーを示す。

(b) はAT8抗体を用いた(a)のイムノプロットである。AT8抗体はリン酸化後のすべてのイソフォームと反応する(偶数レーン;ここに図示していないがhtau37を含む)。

図3: 構築体K3M、K10、K19及びK17の図。K19(99個のアミノ酸残基)は、htau23のQ244-E372配列及びN末端メチオニン残基を含む。これは、反復単位のうち3つを含む(反復単位1、3及び4; 反復単位2はhtau23には存在しない)。

K10(168個のアミノ酸残基)は、htau23のC末端まで伸びている点を除いては、K19と似ている。K17(145個のアミノ酸残基)は、S198-E372配列(キモトリップシン開裂部位から始まり、第2の反復単位は含まず、第4の反復単位の終りまで伸びているアッセンブリードメインとN末端メチオニン残基)を含む。K3M(335個のアミノ酸残基)は、ウシtau4N末端の154個のアミノ酸残基とhtau23(第2反復単位を含まない)のR221-L441配列を含む。K17には、ペプチドS198-T220の位置が示してある。構築体の比較により、AT8の抗原決定基はこの領域にあるにちがいない(図4参照)。

図4: htau40ならびに構築体K10、K17、K3MおよびK19のリン酸化。

(a) SDSゲル。奇数レーンは、リン酸化前のhtau40、K10、K17及びK3Mで、偶数レーンはリン酸化後のそれらである。レーン4には2本のバンドが見られるが、これはK10が完全にリン酸化されていないためである。

(b) AT8を用いた(a)のイムノプロット。抗体は、両方ともリン酸化された状態であるhtau40(レーン2)とK17(レーン6)とのみ反応する。しかし、リン酸化されておりかつMrシフトを示すにもかかわらず、構築体K10(レーン4)またはK3M(レーン8)とは反応しない。

(c) キナーゼとインキュベートする前および後の構築体K19。レーン1及び2はSDSゲルを示す。Mrシフトもリン酸化も見られず、それはオートラジオグラフィーによって確認された(図示していない)。レーン3及び4はAT8を用いたイムノプロットであるが、反応は全く見られない。これにより、抗原決定基は反復領域

には存在しないことが確認された。

図5: トリプシンペプチドS195-R209の図。この15個のアミノ酸残基よりなるペプチド(セリン残基5個とトレオニン残基1個を含む)のS199とS202(配列決定により確定した)を2個の放射性リン酸で標識した。

図6: htau23のD-変異体(S199とS202をアスパルギン酸(D)に変えたもの)のリン酸化及び抗体応。レーン1及び2は、抽出物リン酸化前及び後のhtau23のSDSゲルを示す。レーン3及び4は、抽出物リン酸化前及び後のD-変異体のSDSゲルを示す。D-変異体はhtau23に較べ少し上まで走っていることに注意されたい(レーン1及び3)。しかし、リン酸化後は両方の蛋白質はゲル中で同じ位置をしめる(レーン2及び4)。レーン5~8は、AT8を用いたレーン1~4のイムノプロットを示す。抗体は抽出物リン酸化後のhtau23のみと反応を示す(レーン6)。しかし、未リン酸化のhtau23とも反応しない(レーン5)、Mrの増大シフト及びオートラジオグラフィー(図示していない)によって示されるようにリン酸化されていたにもかかわらずD-変異体とも反応しない(レーン7、8)。レーン9~12は、TAU1を用いたレーン1~4のイムノプロットである。この抗体は、リン酸化前のhtau23(レーン9)のみと反応し、リン酸化したhtau23(レーン10)ともD-変異体(レーン11、12)とも反応しない。アスパラギン酸はリン酸化セリンによく似ているようであり、したがって抗原決定基をマスクする。レーン10におけるhtau23とTAU1のマイナーな反応は、このタンパク質が完全にリン酸化されていないことを示している。

図7: 細菌によって発現させたヒトイソフォームhtau23の脳キナーゼ活性によるリン酸化の経時変化、ならびに対応オートラジオグラム

(a) キナーゼと共に0~24時間インキュベートした後のhtau23のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動。未リン酸化タンパク質はMr0=48kDの単一バンドを示す(レーン1)。レーン3~14は、リン酸化が、明確に示される中間諸段階をそなえた、より高いMrへの漸進的シフトをもたらすことを示している。偶数レーン(図7bの下に4、6、..と番号をふってある)は、10μMオカダ酸(okadaic acid)(OA)の存在下で観察した(図7aの下に「+」印を付けてある)。奇数レーン(3、5、..「-」印を付けてある)では、オカダ酸は使っていない。第1段階は約2時間かかり(新しいMr1=52kDへのシフト)、第2段階は約10時間で完了し(Mr2=54kD)、第3段階は約24時間で完了する(Mr3=56kD)。それに続く24時間の間には、これ以上のシフトは観察されない。レーン2は、この文脈の中では重要でない変異体を示す。

(b)は(a)のオートラジオグラムを示す。この実験で取り込まれたリン酸(mol Pi/mol タンパク質)の量は次の通りである。(-OA/+OA): 30min (0.5/1.0), 60min (0.7/1.4), 120min (1.0/2.0), 10hr (2.0/3.0), 24hr (3.2/4.0)。

図8: (a)は図7aのそれと同様なhtau23のリン酸化の経時変化を示すSDSゲルであるが、全レーンに10μMオカダ酸が存在している。(b)はモノクローナル抗体SM134を用いた(a)のイムノプロットである。この抗体はリン酸化の第2及び第3段階でのみタンパク質を認識するが、第一段階では認識しない。

図9: リン酸化前および後のタウイソフォームの微小管への結合。

(a) 結合実験のSDSゲルで、タウイソフォームhtau40の場合を例としてあげてある[htau40のバンドはチューブリン(T)のそれと明確に分離されるため、煮沸ステップによりチューブリン除去しなくても両成分を同時に示すことができる]。一番上の行は、24時間リン酸化した、またはしていない(Piが+または-)ペレット(P)または上清(S)を示す。レーン1~4は20μMタウタンパク質(合計濃度)で、レーン1および2はリン酸化されており、レーン3および4はリン酸化されていない。レーン1と2を比較すると、リン酸化したタンパク質のほとんどは遊離しており(S)，また他方では小部分のみが微小管と結合している(P)ことがわかる。レーン3および4は、未リン酸化の状態ではタンパク質の約半分が結合しており、残りの半分が遊離していることを示している。(ここでも図7と同様に、リン酸化したタンパク質のバンド、レーン1および2は未リン酸化のもの、レーン3および4、よりゲル中で高いことに注意されたい。) レーン5~8は、1.5μMのhtau40を用いた同様の実験である。レーン9および10は、1.0μMのリン酸化タンパク質の場合を示す。レーン11~15は、htau40のあらかじめ分かっている量(それぞれ1.5、1.0、7.5、5および2.5μM)を用いての濃度補正のためのものである。(b)はhtau23の、(c)はhtau34の、リン酸化前(丸印)および24時間リン

40 酸化後(三角印)の微小管への結合曲線を示す。これらの曲線は、図3aと同様のSDSゲルから得た。重合したチューブリンは30μMである。それぞれの解離定数Kdおよび化学量数は図に示す通りである。どの場合においても、最も劇的な影響は結合部位数に対するもので、これはリン酸化によって約3分の1に減少し、約0.5(つまり、チューブリン二量体各2個に対しタウ1個)から約0.16(チューブリン二量体6個に対しタウ1個)となる。未リン酸化4-反復イソフォーム(htau34など)の結合は特に密であることに注意されたい(Kdが約1~2μM)。

図10: htau40の図で、キナーゼ活性によりリン酸化された7個のSer-Proモチーフの位置を示す。1~4と標識されたボックスは微小管結合に関与する内部反復単位である。いくつかのイソフォームでは2番目のものは存在しない(例: htau23)。N末端近くの斜線を施した2個のボックスは、htau23とhtau40には存在しない挿入配列で、このためこれらの分子はSer-Proモチーフを6個のみ含む。下記の放射性トリプシンペプチドが発見された:

24-49: KDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESpPLQ

191-209: SGDRSGYSSpPGSpPGTPGSR

231-240: TPPKSpPSSAK

396-406: SPVSGDTSpPR

386-406: TDHGAEIVYIKSpPVVSGDTSpPR

407-428: HLSNVSGTGSIDMVDSpPQLATL

260-266: IGSpTENL

図11: htau34のリン酸化前(丸印)および90分間リン酸化後(三角印)の微小管への結合。結合能の減少は24時間リン酸化後のそれと非常によく似ている(図9bと比較)。

図12: アルツハイマー患者および正常なヒトの脳のタウタンパク質のSDSポリアクリルアミド電気泳動、ならびに抗体SMI33, SMI31およびSMI34を用いたそれらのイムノプロット。

(a) レーン1は、正常なヒト対照脳からのタウタンパク質のSDSポリアクリルアミド電気泳動で、Mr 55~65kDの間に5~6本のバンドが見られる(レーン3のPHFタウより幾分低い)。レーン2は、キナーゼ活性によりリン酸化した後の正常なヒトタウを示し、すべてのバンドが上向きにシフトしている。レーン3および4は、リン酸化に関係なくすべてのタウイソフォームを認識する抗体E2 [Kosik et al., Neuron 1 (1988), 817-825] を用いたPHFタウのイムノプロットである。レーン3はアルツハイマー患者の脳から単離されたままのPHFタウを示し、レーン4はアルカリホスファターゼによる脱リン酸化後のそれを示す。脱リン酸化タンパク質のバンドがゲル上で下向きにシフトしていることに注意されたい。

(b) SMI33を用いた(a)のイムノプロット。この抗体は正常なヒトタウ(レーン1)および脱リン酸化後のPHFタウ(レーン4)を認識する。

(c) SMI31を用いた(a)のイムノプロット。この抗体は、リン酸化後の正常ヒトタウと自然なリン酸化状態にあるPHFタウ(レーン2および3)を認識することに注意されたい。

(d) SMI34を用いた(a)のイムノプロット。この抗体は、リン酸化後の正常ヒトタウ(レーン2)とPHFタウ(レーン3)を認識する。

図13: 細菌によって発現させたヒトイソフォームhtau23のリン酸化の経時変化(前に掲げた図と同様の

もの)、ならびに抗体SMI33, SMI31, SMI34, TAU1およびAT8を用いたイムノプロット。

(a) リン酸化時間0~24時間までのSDSゲルで、連続的なMrのシフトを示す。

(b~f) SMI31, SMI34, SMI33, TAU1およびAT8を用いたイムノプロット。抗体SMI33およびTAU1は、第1段階の終りまで(2時間)完全にhtau23を認識するが、抗原決定基は第2段階でブロックされてしまう。抗体SMI31, SMI3

10およびAT8は、このタンパク質をリン酸化の第2段階および第3段階でのみ認識するという点で、相補的である。

(g~h) SMI31同様リン酸化の第2段階以降このタンパク質を認識するSMI35およびSMI310を用いたhtau34のイムノプロット。

図14: タウおよび構築体のSDSゲル、ならびに抗体SMI33, SMI31およびSMI34を用いたイムノプロット。

(a) SDSポリアクリルアミド電気泳動。レーン1および2はキナーゼによる24時間のリン酸化前および後の構築体K10を示す。レーン3および4は、リン酸化前および後の構築体K17を示す。レーン5および6は、リン酸化前および後の構築体K19を示す。K19以外の構築体はすべてリン酸化の結果シフトを示す。K10については、3本のバンドのシフトが観察され、K17についてはシフトしたバンドは1本のみである。

(b) SMI33を用いた(a)のイムノプロット。この抗体は、未リン酸化形態のK17(レーン3)のみを認識し、抗原決定基が反復単位の前にあることを示唆している。

(c) SMI34を用いた(a)のイムノプロット。この抗体はリン酸化形態のK10およびK17を認識する(一番上のバンドのみ、レーン2および4)。この抗体はK19(反復領域)を認識しないが、N末端側およびC末端側の両方にその反復単位の配列を要求する。したがって、抗原決定基は非連続的(コンホーメーション依存性)である。

(d) SMI31を用いた(a)のイムノプロット。この抗体はリン酸化されたK10(レーン2)の一番上のバンドのみを認識し、抗原決定基が反復領域の後にあることを示唆している。

図15: htau40およびhtau23の点変異体の図。

図16: htau40および図15に示されたその点変異体のSDSゲル、ならびに抗体SMI33, SMI31およびSMI34を用いたイムノプロット。

(a) レーン1~8は、htau40とその変異体KA P235, KAP396およびKAP235/396の未リン酸化形態およびリン酸化形態(+)におけるSDSゲルである。どの場合においても、リン酸化はSDS

ゲルにおける上向きの移動をもたらす。
(b) SMI33を用いた(a)のイムノプロット。抗体応答はS235が変異を起こしていると、脱リン酸化状態でもリン酸化状態でも(レーン3+4、7+8)、著しく減少する。これは、(脱リン酸化した)第1のKSPモチーフがSMI33の抗原決定基の一部であることを示している。S396をアラニンに変異させてもその変異体の挙動は親分子と同様である。つまり、脱リン酸化状態では強い抗体応答を示し、リン酸化状態では全く反応しない。従ってS396はSMI33の抗原決定基に寄与していない。

(c) SMI31を用いた(a)のイムノプロット。この抗体は、リン酸化形態のhtau40とすべての変異体を認識する(レーン2、4、6および8)。これは、2個のKSPモチーフのリン酸化が、抗原決定基の主要な決定要素ではないことを示している。

(d) SMI34を用いた(a)のイムノプロット。反応はSMI31に似ているがより明白であり、ここでも2個のKSPモチーフが主要決定要素ではないことを示している。

図17: タウの欠失変異体およびそれらの抗体応答。
(a) 2個の反復単位のみをもつ構築体(K5~K7)または1個のそれのみをもつ構築体(K13~K15)のリン酸化前および後のSDSゲル。(b) SMI34を用いた(a)のイムノプロット。この抗体はリン酸化されたタンパク質をすべて認識することに注意されたい(K7は弱く認識するのみであるが)。(c) SMI31を用いた(a)のイムノプロット。この抗体は、リン酸化された2-反復分子(K5~K7)を認識するが、1-反復分子(K13~K15)は認識しない。レーン7および8は対照としてのhtau40を示す。(d)は構築体K2、K3MおよびK4のリン酸化前および後のSDSゲルである。(e) SMI34を用いた(d)のイムノプロットで、この抗体はリン酸化されたK4のみを認識する。(f) SMI31を用いた(d)のイムノプロットで、リン酸化されたK2のみを認識する。

図18: htau40と本研究に使用した種々の変異体の図。

図19: タウの二量体化ならびにオリゴマー化の研究に使用されたタウイソフォームおよび構築物の図。

(a) T8R1-1. 553個のアミノ酸残基からなり、分子量57743で、htau40由来(下記参照)。これはN末端近くに2つの挿入配列(それぞれ29個のアミノ酸からなる、斜線部分)、および4つの反復単位(1~4)が小さいスペーサーをはさんで繰り返す反復領域を含む。

(b) T8R-2. 511個のアミノ酸残基よりなり、分子量53459。これはN末端部の挿入配列を欠くが、重複する4つの反復単位を有する。

(c) T7R-2. 480個のアミノ酸残基よりなり、

分子量50212。T8R-2に類似しているが、最初の反復領域に第2の反復単位を持たない。

(d) htau40. 441個のアミノ酸残基よりなり、分子量45850で、ヒトタウイソフォーム6種のうち最大のもの(Goedert et al.)、N末端部挿入配列2つと、4つの反復単位からなる反復領域を含む。

(e) htau23. 352個のアミノ酸残基よりなり、分子量36760で、ヒトタウイソフォームのうち最小のもので、N末端部挿入配列をもたず、反復単位のうち3つのみを含む。

(f) K11. 152個のアミノ酸残基よりなり、分子量16326で、4つの反復単位よりなる反復領域に短い尾がついたもの。(g) K12. 121個のアミノ酸残基よりなり、分子量13079で、3つの反復単位よりなる反復領域に短い尾がついたもの。

図20: タウ構築体および架橋生成物のSDSポリアクリルアミド電気泳動(4~20%)ならびにゲルクロマトグラフィー。ゲルaおよびcは還元条件下で走らせ(サンプル緩衝液中3mM DTT)、ゲルbは非還元条件下で

走らせた(ただしレーン1のみはサンプル緩衝液中に3mM DTT含有)。

(a) 構築体T8R-1, htau23、およびK12。分子量マーカーを左側に示す。

(b) 構築体K12および架橋生成物。架橋はDTTの不在下で自然に起こる。これはDTTで防止するか、またはPDMあるいはMBSを加えて誘導することができる。凝集産物は右側に明示してある(单量体、二量体、三量体、四量体、等)。

(c) PDMで架橋したK12をスーパーローズ(Superose)12でゲル通過し、銀染色したSDSゲル。二量体(一番上のバンド)は单量体の前に溶出する。画分16および17は電子顕微鏡検査に使用した。

(d) PDMで架橋した構築体K12の单量体および二量体の、Superose12ゲル通過の溶出プロファイル。標準タンパク質の溶出位置は、有効水和ストークス半径に対して対数目盛りでプロットしてある(縦軸)。

(e) 構築体K12の円二色性スペクトル(40mM HEPE, pH7.2中8mg/ml、行路長0.01m)。重要な α ヘリックス構造または β シート構造は見られない。他の構築体および全長タウからも同様なスペクトルが得られる。

図21: 構築体K12から合成した対らせん状フィラメント。

(a) K12から合成したPHFのもつれ(約70~75nmの交差周期(period)を矢印で示してある)。この構築体は前に記述した方法によって発現させ、精製した(Steiner et al.)。それを0.5Mトリス-塩酸で、pH5.0~5.5の間で透析した。その溶液を2%酢酸ウラニルでネガティブ染色した。

(b) および(c) 構築体K12から合成した対らせん

25

状フィラメントの螺旋維。交差反復（矢印）および長さ約100 nmの棒状の粒子（cの中央部）に注意されたい。横線=100 nm。

図22：PDMで架橋したK12二量体から合成し、1%リンタングステン酸でネガティブ染色した対らせん状フィラメント（顕微鏡写真はM. Knielより提供された）。横線=100 nm。

図23：アルツハイマー患者脳の対らせん状フィラメント（顕微鏡写真はDr. Lichtenberg-Kraagより提供された）。（a）Wischikらに従って調製し、1%リンタングステン酸で染色した、神経原纖維もつれ由来のPHF。この調製物は、まだプロナーゼ感受性ファッジーコートを保持している均一な長いフィラメントを含有する。交差反復は75~80 nmで、幅は最小約10 nmから最大22 nmまで変動する。

（b）GreenbergおよびDavisに従って調製したPHF。この調製物は上記（a）よりも長さの短い可溶性フィラメントとなり、またより不均質である。（1）は反復が72 nm、幅が8~18 nmまで変動する対らせん状フィラメントである。（2）は幅8 nmの直線フィラメントである。（3）は特に大きい直径（25 nmまで）をもつねじれたフィラメントである。（4）は大きい直径（18 nm）をもつ直線フィラメントである。（5）は長さが約1交差周期に等しい約80 nmである、ねじれた棒状粒子である。多くの場合、粒子はフィラメントが途中で切れたものである。例えば、（4）で印を付けた2本の棒、（3）のねじれたフィラメント及びその右の短い切株状のもの、または粒子の上の2本の真っ直ぐな棒（3）がそうである。横線=100 nm。

図24：グリセロール吹き付け及び金属影つけによって調製したタウイソフォームhtau23および構築体T8R-1の電子顕微鏡写真。

（a）htau23の単量体、（b）htau23の二量体、（c）T8R-1の単量体、（d）T8R-1を折りたたんだ形態（ヘアピン型の折り目が分子内の逆平行会合を示している）、（e）T8R-1の二量体。長さについては、表1及び図25参照。説明図を右側に示した。横棒=50 nm。

図25：タウ構築体および二量体の長さを示す棒グラフ。

図26：構築体K11およびK12の電子顕微鏡写真。（a）K11の単量体、（b）K11の二量体、（c）2個の二量体の縫合によって形成されるK11の四量体、（d）K12の単量体、（e）K12の二量体、（f）K12の四量体。横棒=50 nm。

図27：（a）PDMで架橋したK12二量体（例えばCys322からCys322へ）；

（b）MBSで架橋したK12単量体（例えばCys322から近くのLysへ）。横棒=50 nm。

26

図28：htau23、K12およびK12の架橋生成物の抗体標識。

（a）htau23の二量体で抗体を片方の端にもつもの（左側の写真）、および抗体を両端にもつ（右側の写真）htau23の逆平行二量体化を示しているもの；

（b）K12の二量体で抗体を片方の端にもつもの（左側の写真）、両端にもつもの（中央の写真）、および自由端に抗体をもち（右側の写真）このタイプの会合が抗原決定基をブロックすることを示しているK12の四量体と推定されるもの；

（c）PDMで架橋したK12の二量体で、抗体を片方の端にもつもの（左側の写真）、両端にもつもの（中央の写真）、および四量体で自由端に抗体をもつ（右側の写真）；

（d）MBSで架橋したK12の二量体で、抗体を片方の端にもつもの（左側の写真）、両端にもつもの（中央の写真）、および四量体で自由端に抗体をもつ（右側の写真）。横棒=50 nm。

図29：htau40のGSK3によるリン酸化の経過、ならびに免疫応答。

（1）キナーゼと共に0~24時間37°Cでインキュベートした後のhtau40のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動。レーン1のマイナーな低い方のバンドは断片である。脳抽出物およびMAPキナーゼの影響に類似した、より高いMrへの漸進的シフトに注意されたい。

（2）オートラジオグリー。

（3）約2時間後（S199とS202のリン酸化後）には反応性がなくなる抗体TAU1を用いたイムノプロ

30 ット。

（5）SMI34（コンホメーション感受性およびリン酸化セリンに反応する）を用いたイムノプロット。

（6）SMI31（抗原決定基はリン酸化S396およびS404を含む）を用いたイムノプロット。

（7）脱リン酸化S235を要求する抗体SMI33を用いたイムノプロット。MAPキナーゼまたは脳抽出物によるリン酸化に関して幾つかの相違がある。SMI33の染色は長時間持続し、Ser235がGSK3によって緩慢にしかリン酸化されないことを示している。SMI31の染色は、AT8またはSMI34のそれの前に、非常に迅速に出現し、S396およびS404はGSK3の最も早期の標的に入っていることを示している。

図30：GSK3を用いたリン酸化による移動度シフト：htau23とその変異体/A404の比較。上の図はSDSゲルで、下の図はオートラジオグラフィーである。レーン1~3は、それぞれ未リン酸化、2時間リン酸化および20時間リン酸化のhtau23である。明瞭な変化とリン酸の明白な取り込みに注意されたい。

50 レーン4~6は、それぞれ未リン酸化、2時間リン酸化

および20時間リン酸化の変異体Ser404-Alaである。2時間後のシフトはhtau23のそれよりもかに小さく、リン酸化の度合いははるかに低い。これは最初の強烈なシフトとリン酸化が、MAPキナーゼおよび脳抽出物のキナーゼ活性を用いる場合と同様、Ser404で起こることを示している。

図31：タウ構築物の図。上の図は、htau23の誘導体すべてのSer-ProまたはThr-ProモチーフをAla-Proに変えたAP17を示す。真中の図は、Ser-ProモチーフのみをAla-Proに変えたAP11を示す。下の図は、タウの4個の反復単位のみからなるK18を示す(htau40から誘導)。

図32：MAPキナーゼおよびGSK3とブタ脳微小管との共重合。(a)微小管精製段階のSDSゲル。Ex=脳抽出物、最初のコールドスピンを行なった後の上清。S=最初のホットスピンの上清。チューブリンとMAPは37°Cに加熱した後は微小管に組み入れられない。P=再溶解した微小管のペレット。他のレーン(S, P)は、温度変化によるアッセンブリーとディアッセンブリーの異なる2周期を示す(最後の微小管ペレットは濃縮した)。(b)抗MAPキナーゼを用いたイムノプロットで、主にp42イソフォームと、p44イソフォームのいくつかを示している。(c)抗GSKB3βを用いたイムノプロット；この抗体はGSKB3αと交差反応を示すことに注意されたい。(d)抗GSKB3αを用いたイムノプロット。これらのプロットは、両方のキナーゼおよびそれらのイソフォームが微小管アッセンブリーの周期を重ねるにつれて共に精製されることを示している。

図33：(a)正常な脳抽出物およびアルツハイマー脳抽出物におけるGSK3αおよびβの同定。M=マーカー、レーン1は正常な脳抽出物のSDSゲル、レーン2は抗GSK3αを用いたイムノプロット、レーン3は抗GSK3β(αに対し幾分交差反応性あり)を用いたイムノプロット。レーン4および5はアルツハイマー脳抽出物による同じイムノプロット。

図34：htau23の微小管(20μMタキソールの存在下で10μMチューブリンより作製した)への結合曲線。一番上の曲線(四角印)は未リン酸化htau23を示す。真中の曲線(丸印)はGSK3でリン酸化したhtau23で、修飾されていないタウタンパク質に匹敵する化学量論を示している(チューブリン二量体1個あたり0.6個を飽和)。下の曲線(三角印)は、脳キナーゼ活性によりリン酸化された対照htau23で、化学量論の顕著な低下を示している。実線は、別々の結合部位を想定して最善に調整した曲線を示す。

図35：(a)この発明に使用したhtau23とその点変異体の図。(b)htau23とその点変異体の、未リン酸化状態および脳抽出物によりリン酸化された状

態での、微小管への結合曲線。一番上の曲線と一番下の曲線はそれぞれ野生型htau23の未リン酸化のものとリン酸化されたものを示し、他の曲線はすべてリン酸化後のタンパク質を示す。変異体は(上から順に)、Ser262-Ala, Ser235-Asp/Ser396-Asp, Ser404-Ala, Ser202-Alaである。Ser262の変異は、タウ-微小管相互作用のリン酸化に対する感受性をほとんど排除する。これらの曲線は、定量的SDSゲルから濃度計によって誘導した(実施例6参照)。重合したチューブリンは30μMである。それぞれの化学量論n(=タウ/チューブリン二量体)および結合定数Kd(μM)は：野生型htau23未リン酸化(n=0.49, Kd=2.5)；A262リン酸化(n=0.45, Kd=5.3)；D235/D396リン酸化(n=0.32, Kd=7.4)；A404リン酸化(n=0.32, Kd=9.3)；A202リン酸化(n=0.31, Kd=9.4)；野生型htau23リン酸化(n=0.16, Kd=4.9)。

図36：htau40の微小管への結合曲線。一番上の曲線は未リン酸化htau40(三角印)、真中の曲線はMAPキナーゼによりリン酸化されたhtau40(丸印)、一番下の曲線は脳抽出物によりリン酸化されたhtau40(四角印)を示す。それぞれの解離定数Kdおよび化学量論は図に示す通りである。

図37：(a)全変異体AP18の図。すべてのSer-ProおよびThr-ProをAla-Proに置き換えた。更にSer262および356をAlaに変異させた。変異体AP17では、Ser262および356は変化しないで残っている。

(b)htau23ならびに「全」変異体AP17およびAP18の、脳抽出物によってリン酸化されていない、またはされた状態での、微小管への結合曲線。一番上の曲線は未リン酸化htau23(黒三角)を、真中の曲線はリン酸化AP18(丸印)を、下部の2本の曲線はリン酸化AP17(白抜き四角)およびhtau23(白抜き三角)を表す。AP17とAP18の挙動の違いは、AP17におけるSer262のリン酸化によるものである。それぞれの化学量論および結合定数は：

野生型htau23、未リン酸化(n=0.49, Kd=2.5)；AP18リン酸化(n=0.48, Kd=6.1)；AP17リン酸化(n=0.18, Kd=6.6)；野生型htau23リン酸化(n=0.16, Kd=4.9)。

図38：クロマトグラフ法によるブタ脳由来キナーゼの調製。

(a)モノ(Mono)Q HR 10/10 FPLC。粗換え体htau34および構築体AP17のリン酸化は、縦軸にタウ1モルあたりに取り込まれたリン酸のモル数として示してある。タウの微小管への結合を低下させる画分は、画分

12、20および30のあたりで溶出し、画分20から30の間のピークが最も効力がある。(b) Mono Qカラムから溶出した画分28~32をスーパーデックス(Superdex)G-75ハイロード(HiLoad)16/60カラムでゲル通過した。カラムは黒い四角印が示すように、標準タンパク質によって校正した:リボヌクレアーゼ、14kDa1;キモトリップシノーゲンA、25kDa1;オボアルブミン、43kDa1;ウシ血清アルブミン、67kDa1。分子量は右縦軸に対数目盛りで示してある。htau34および構築体K18のリン酸化は左縦軸に示す。最高の活性は分子量約35kDa1で溶出する。

(c) ゲル通過カラムからの画分17~23をプールし、再度Mono Q HR 5/5カラムによるクロマトグラフィーにかけた。画分10は結合試験に使用した。(d) 主要精製段階を示すSDSゲル。Mはマーカーたんぱく質、レーン1は全脳抽出物、レーン2はMono Q HR 10/10 FPLCの画分30、レーン3はSuperdexゲル通過の画分22、レーン4~5はMono Q HR 5/5 FPLCの画分10および9を表す。レーン5は、精製された35kDa1バンドと41kDa1の痕跡を示す。

図39: キナーゼ活性のSDSゲルおよびゲル内アッセイ(詳細は実施例11参照)。(a) Mono Qカラムによる2回目のクロマトグラフィー(図38c参照)の画分9~11(レーン1~3)を7~15%シルバーで染色したSDSゲル。(b) ゲル内実験のオートラジオグラム。タウ構築体K9(タウの4個の反復単位アラスC末端尾からなる)をゲルに入れ、そこに画分9~1よりそれぞれ5μlの試料を加えた(レーン1~3)。(c) 対照ゲルのオートラジオグラム。このゲルはタウ蛋白質を全く含まず、Mono Q画分の自己リン酸化は全く見られない。再生したタンパク質はゲル外へ拡散する傾向があるので、これらのゲルから特定のキナーゼ活性の量を計ることは難しいことに注意されたい。35kDa1のバンドについては特にそうである。

図40: 35kDa1キナーゼによるタウのリン酸化がゲル変化ならびに微小管結合に及ぼす影響。

(a) 数個のキナーゼによってリン酸化されたhtau23および構築体のSDSゲル。Mはマーカーたんぱく質。レーン1および2は、それぞれ35kDa1キナーゼによってリン酸化されていないhtau23とリン酸化されたそれを表す。レーン3および4は点変異体htau23(Ser409-A1a)を用いた同じ実験を表す(変化なし)。レーン5および6は点変異体htau23(Ser416-A1a)を表す(タンパク質の一部のみがリン酸化されているが、その他はレーン2の変化と同じ)。レーン7および8は点変異体htau23(Ser404-A1a)を表す(レーン2および6と同じ変化)。変異体は35kDa1キナーゼがSer409をリン酸化することによって変化を引き起こすことを示している。Ser404はMAPキナーゼの標的

で、Ser416はCaMキナーゼの(Steiner et al. 同頁)、Ser409とSer416はPKAの標的で、それらの各々はシフトを引き起こすことに注意されたい。レーン9~11は、異なるキナーゼ(CaMキナーゼ、PKAおよびMAPキナーゼ)によってhtau23に引き起こされた変化を示す。PKAによって引き起こされた変化(レーン10)は、35kDa1キナーゼによるそれと全く同じである。また、MAPキナーゼはそれより遙かに大きく最大の、タウのアルツハイマ

10 一様状態に典型的なシフトをもたらす。右側の横線は変化のレベルを示す。下から上に向かって、未リン酸化htau23(対照)、CaMキナーゼシフトレベル、PKAシフトレベル、MAPキナーゼシフトレベルである。すべてのシフト部位はC末端の近くである。

(b) htau23および変異体Ser262-A1aの、35kDa1キナーゼによってリン酸化されていない状態またはリン酸化された状態での(Mono Q画分10、20時間)、微小管への結合曲線。上の曲線は未リ

20 ン酸化htau23(白抜き丸、n=0.49, Kd=2.5μM);真中の曲線はリン酸化された変異体(四角印、n=0.44, Kd=11.6μM);下の曲線はリン酸化されたhtau23(黒丸、n=0.21, Kd=8.8μM)を表す。Ser262が存在しないと化学量論の減少は0.05であり、Ser262がリ

20 ン酸化されているとその減少は0.28である。

図41: htau40の図で、微小管と結合する第1反復単位および微小管結合に重要なSer262を目立たせてある。

図42: 1. ³²Pで標識したhtau40(「ht40 ³²P」)の異なるPPasesを用いた脱リン酸化。7~15% SDS勾配ゲルのオートラジオグラム。

図43: 7~15% SDS勾配ゲルのオートラジオグラム。

A. PP2a H-イソフォーム(10μg/ml)による脱リン酸化

レーン1: 脱リン酸化前のht40P

レーン2: 10分脱リン酸化

レーン3: 30分脱リン酸化

レーン4: 120分脱リン酸化

B. PP2a M-イソフォーム(10μg/ml)による脱リン酸化

レーン1~4: 上記A参照。

C. PP2a L-イソフォーム(10μg/ml)による脱リン酸化

レーン1~4: 上記A参照。

D. PP1の触媒サブユニット(500U/ml)による脱リン酸化

レーン1~4: 上記A参照。

図43: 2. PP2a-Hによる脱リン酸化: リン酸化依存性抗体の抗原決定基の消失。

31

【0084】A. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(7-15%)

レーン1: 脱リン酸化前のht40P

レーン2: 10分脱リン酸化

レーン3: 30分脱リン酸化

レーン4: 120分脱リン酸化

レーン5: 5時間脱リン酸化

レーン6: 16時間脱リン酸化

B. オートラジオグラ

C. AT8によるイムノプロット

D. Tau-1Aによるイムノプロット

E. SMI-33によるイムノプロット

図44: PP2a-Hによる脱リン酸化の速度論

a. 異なる濃度のPP2aを用いたht40Pの脱リン酸化の経時変化

b. ht40P濃度の変動: ミカエリス・メンテン(Michaelis-Menten)の図

図45: タウタンパク質の2個のIGSモチーフおよび2個のCGSモチーフ(セリン262、293、324、356)をリン酸化する70kDa1キナーゼの調製。このキナーゼはタウの微小管への親和性を激しく減少させる。

(a) エースセファロース(S-Sepharose)を用いたクロマトグラフィー。キナーゼ活性は250mMNaClで溶出する。

(b) ヘパリンアガロースを用いたクロマトグラフィー。キナーゼ活性は250mMNaClで溶出する。

(c) スーパーデックス(Superdex)G-75によるゲル通過。キナーゼ活性は70kDa1で溶出する。

図46: cdk2/サイクリンAによるhtau40のリン酸化の経時変化。レーン1~9はそれぞれ0、10、30、90分、3、6、10、24時間、および0分に対応する(0分のレーンは対照である)。

(a) リン酸化によるタンパク質の変化を示すSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動。

(b) リン酸取り込みの増加を示すオートラジオグラム。

(c) 未リン酸化Ser199およびSer202のみを認識するTAU-1抗体を用いたイムノプロット。

(d) アルツハイマーのほかに、リン酸化された上記のセリン2個も認識するAT8抗体を用いたイムノプロット。

【0085】

【実施例】実施例1 タウタンパクの調製

正常な脳からのタウの調製: ヒト、ウシ、またはブタの脳からのタウの調製、脱リン酸化および再リン酸化は基本的にHagstedt et al., J. Cell. Biol. 109(1989), 1643-1651 によった。

アルツハイマー脳からのタウの調製: 神経病理学的にアルツハイマー病であることが確認されたヒトの脳の組織

32

はさまざまな供給源から得られた。剖検は死後1時間から25時間の間に行われた。脳組織は-70°Cで保存した。

PHFからのタウはGreenberg & Davies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(1990), 5827-5821の方法に従って調製した。

実施例2 ブタ脳抽出液のタウリン酸化活性(プロテインキナーゼ)の性質と部分的精製

ブタの脳抽出液の上清を硫酸沈殿によって分画した。キナーゼ活性の主画分は40%飽和で沈殿した。この分画を10ゲルろ過によって脱塩し、5倍に希釈し活性化緩衝液(2.5mMトリス、2mM EGTA、2mM DTT、40mM p-ニトロフェニルホスフェート、10μMオカダ酸、2mM MgATP、プロテアーゼ阻害剤)中、37°Cで2時間インキュベートした。このインキュベーション中、抗ホスホチロシンmAbを用いたウェスタンプロットによって示されるように、44kDaタンパクのチロシン残基のリン酸化が生ずる。この44kDaタンパクは第2mAbを用いてMAP2キナーゼであることが同定された。

【0086】この粗酵素活性をさらにイオン交換クロマトグラフィー(Mono Q FPLC, Pharmacia)で精製した。ウェスタンプロットで示される活性化MAPキナーゼを含む画分は、最も顕著なタウリン酸化活性をもつ(ピークI)。2番目のタウリン酸化活性(ピークII)は同様のSDS-ゲルシフトおよびタウのアルツハイマー特異的抗体反応性をもたらさない。

実施例3 アルツハイマータウタンパク特異的エピトープを決定するための粗換えタウポリペプチドをコードする遺伝子をもったプラスドの構築

タウ構築物のクローニングと発現: プラスミドの調製とクローニングはSambrook et al., Molecular Cloning Laboratory Handbook, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989に従って行った。ポリメラーゼ連鎖反応(RCR, Saiki et al., Science 239(1988), 487-491)による增幅は、メーカー(Perkin Elmer Cetus)指定の方法で、Taqポリメラーゼを用いておこなった。タウ遺伝子とその構築物はpET-3b(Rosenberg et al., Gene 56(1987), 125-135)をタウ遺伝子の操作に便利なように、PstI, HindIII, NheIおよびEcoRV制限部位を除去して改変した誘導体である、発現ベクターpNG2を用いて発現させた。発現のためにはBL21(DE3) E.coli系(Studier et al., Molecular Biology 185(1990) 60-89)を用いた。大部分の構築物は、352残基とC末端の微小管結合領域(Goedert et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(1988), 4051-4055)の3つの内部反復をもつ、ヒトのイソフォームhtau23から出発して得たものである。ここで用いられている残基番号は、ヒトのイソフォーム中で最大(441残基, Goedert et al., 同上)のhtau40の配列によっている。種々のコンストラクトの分離にはタンパクの熱安定性が用いられた。これらはHagstedt et al., J. Cell

50

33

Biol. 109(1989), 1643-1651 によって述べられた方法に従って FPLC Mono S (Pharmacia)クロマトグラフィーによって分離した。

K10：これは 168残基 (第2反復単位のV275-S305 を欠く、Q244-L441 と開始メチオニン) より成る、htau 23イソフォームのカルボキシ末端部分をもつ。K10タウカセツはpNG2/htau 23ベクター中、Nde I-Pst I 断片を欠失させ、これを化学合成したヘキサマー、5' T ATGCA3'によって置き換えることによってつくりだされた。再連結反応後、Nde I エンドヌクレアーゼサイトは元の配列に戻るが Pst I サイトは損傷をうける。コンストラクトK11およびK12はhtau 23およびhtau 24遺伝子から得られた断片の組合せによって作られた。K11は4つの反復単位および 152アミノ酸 (Q244-Y394 と開始メチオニン) よりなるタウ誘導体である。K12は3つの反復単位と 121アミノ酸 (htau の残基番号で第2反復単位V275-S305 を欠く、Q244-Y394 と開始メチオニン) よりなる tau誘導体である。htau 23およびhtau 40はそれぞれ 352および 441アミノ酸より成るヒトtau イソフォームである (8)。

K17：K17 tauカセット (145残基) はK16の短かい誘導体である。これは2段階でつくられた。最初のK16はヒトhtau 24遺伝子を操作するためにPCRを用いて構築された。増幅した断片の両端への5'制限サイトの“add on (付加)”を行い、PCR産物のクローニングベクターへの挿入の便を計った。開始プライマー (JB50) はGGCG (“G/Cクランプ”) という配列、Nde I ヌクレアーゼの認識サイトCATATG (ユニバーサルATG開始コドンを含む) をもち、これにアミノ酸S198-T205 の情報コードが続いている。終止プライマー (JB51) は “G/Cクランプ” およびBamHIの認識配列GGATCCをもち、これに終止アンチコドンとC末端アミノ酸P364-E372 に対するアンチコーディング配列が続いている。K16 tauカセットは、htau 40 (S198-E372)からの 175残基と開始メチオニンとの 176残基より成る。この断片はS198 と、E372 で終わる4反復単位の配列があとにつづく最初の反復単位のはじめの残基との間の46残基より成る、アセンブリードメインの一部をあらわしている。第2段階として、新らしく作られたtau K16カセットからのBstXI-BstXI 断片と、3つだけの反復単位を含むhtau 23遺伝子から得られた、同様のBstXI-BstXI 断片とを交換し、新らしいタウカセットK17が得られる。このようにしてK17は、第2のタウ反復単位を欠いているがK16と同様のプロジェクション(projection)ドメインを有する。K3M (355残基) はウシのTau 4 (プラスミドpETNde 43-12由来、Himmler et al., Mol. Cell. Biol. 9(1989), 1381-1388)からのアミノ末端の 145残基と、ヒトhtau 23 (プラスミドpUC18/htau 23由来、Goedert et al., 1988, 前掲) からのカルボキシ側の190残基からできたキメラである。この分子は3

34

つの反復単位と、これら29残基より成る2つのアミノ末端挿入部をもっている。K3MはpETNde 42-12からXma I-Bcl I 切断を切り出し、これをhtau 23遺伝子に由来する同様の Xma I-Bcl I 断片で置き換えることによってつくられた。この操作によって64残基 (bTau 4 の Xma I-Xma I 断片) が除かれ、カルボキシ末端の3反復単位が4反復単位で置き換えられた。K19はhtau 23の3反復単位を含み、99残基より成る (反復単位2を欠くQ244-E372 プラス開始メチオニン)。K19分子はK17を用い、144塩基の長さの Nde I-Pst I 断片を合成ヘキサマー5' T ATGCA3'で置き換えることによってつくれた。この改変によって分子の先頭の Nde I サイトは無傷で残され、Pst I サイトは除かれる。

htau 23のD-変異体の構築：htau 23においてS199とS202をDで置き換えるために、アミノ酸G164-P219をコードする二重鎖DNAカセットをデザインした。このDNA断片は8オリゴヌクレオチド (長さ30-60ヌクレオチド) から組立てられ、Sfi I および Xma I 粘着末端をもつ。組立てられたカセットを、もとから存在する Sfi I-Xma I 断片を除去し、直線化した pNG2/htau 23ベクターに挿入することによって必要とする遺伝子が得られる。

htau 23/A404 の構築：htau 23/A404 は、セリンリシン酸化サイトを除くためにSer404がAla に置き換えられた変異htau 23分子である。htau 23遺伝子の操作上の便宜のために、人工的な Nco I 制限サイトを1161位 (htau 40の番号づけ) に導入した。この変異はPCR-SOE (オーバーラップ エクステンション(overlap extension))によるスプライシング、Higuchi et al., Nucl.

Acids. Res. 16(1988) 7351-7367) を用いて導入した。新らしい Nco I サイトはタウタンパクのアミノ酸配列に影響しない。404位へのAla の導入は、Nco I と Nhe I 制限サイトの間の120bp DNA断片をもつ合成DNAカセットを用いた。このDNA断片は4オリゴヌクレオチド (54から66ヌクレオチドの長さ) から組立てられ、Nco I および Nhe I 粘着末端をもつ。組立てられたカセットを、もともと存在していた Nco I-Nhe I 断片を除去した、直線化した pNG2/htau 23/Nco I ベクターに挿入するとhtau 23/A404 遺伝子が得られる。K2 (204残基) はウシ Tau 4 のアミノ末端からの36残基とhtau 23のカルボキシ側の 168残基より成るキメラであり、3つの反復単位をもつ。K4-K7はただ2つだけの反復単位をもつhtau 23の欠失変異体であり、K4は反復単位No. 1および3 (D345-A426 の切り出された 270残基) をもち、K5は反復単位No. 1および3 (D345-T386 の切り出された 310残基) をもち、K6は反復単位No. 3および4 (T245-K275 の切り出された 322残基) をもち、K7は反復単位No. 1および4 (V306-Q36 の切り出された 321残基) をもつ。反復単位No. 2は

htau 23には常に存在していないことに注意されたい。

K13-K15はh_{tau} 23の欠失変異体であり、ただ1つの反復単位しかもたず、K13は反復単位No. 4 (T245-Q336 の切り出された 291残基) をもち、K14は反復単位N. 0. 3 (T245-S305 およびD345-D387 の切り出された 279残基) をもち、K15は反復単位No. 1 (D345-D387 の切り出された 278残基) をもつ。

実施例4 タウタンパク中のアルツハイマー特異的エピトープの決定

アルツハイマー脳からのPHFに対する一群の抗体を反応性についてくわしく調べ、そのうちの一つ(AT8)がPHFタウに特異的であることがわかった。図1は抗体AT8の異なるタウに対する反応性を示したものである。アルツハイマーPHF由来のタウの場合、抗体はすべてのイソフォームを認識する(図1b、レーン1)。正常なウシまたはヒトの脳から得たタウのイソフォームの混合物をテストすれば(図1a、レーン2-5のごとく、リン酸化は混合状態にあることがわかっている)、AT8抗体(図1b)との反応性が検出できる。同じことは、大腸菌で発現させたヒトの異なる6個体のイソフォームを用いてもなりたつ(非リン酸化、図1aおよび1b、レーン6-11)。AT8はたしかにアルツハイマータウに特異的であり、とりわけこれは正常なタウには存在せず、PHFにのみ存在するリン酸化エピトープと反応することが結論される。さらに、AT8の反応性、リン酸化、および電気泳動移動度の間には相関が存在している。SDSゲル中で上方へのシフトを生じるアルツハイマー様のリン酸化の存在があるように思われる。

【0087】この挙動の原因となるキナーゼと、対応するリン酸化のサイトを同定するために、ブタの脳の抽出物を実施例2に述べた方法で調製した。大腸菌で発現させた6つのヒトのイソフォームをホスファターゼの阻害剤であるオカダ酸の存在下で、この活性を測る標準手法に従ってリン酸化した。図2aは、各々のイソフォームが、ゲル中での電気泳動移動度にかなり大きな変化があり(上方へのシフト)、AT8抗体と強い免疫反応性をもつことを示す(図2b)。これらの結果は、このキナーゼによるタウのリン酸化は、アルツハイマー状態の場合のリン酸化と類似のものであることを示している。さらに、すべてのイソフォームは同じような影響をうけていることから、リン酸化部位はすべてのイソフォームについて共通の領域にある筈である。

【0088】上記共通領域を同定するための戦略は、そのサイトの範囲を狭めるために、まず実施例3で述べたように遺伝子操作によってつくった変異体を用い、ついで直接の塩基配列解析によって決定することである。図3は用いたいくつかの変異体K19、K10、K17およびK3M(実施例3参照)について調べたものである。K19を除くと、これらすべての変異体はキナーゼ活性によりリン酸化され、SDSゲル中で上方へのMシフトを示す

(図4a)。K19は31または32残基の3反復単位のみを含む構築物である。これはキナーゼ活性によってリン酸化されず、従ってSDSゲル中でシフトを示さない(図4c)。

【0089】このことは、リン酸化サイトは反復領域の外にあることを意味する。リン酸化は反復領域のどちら側でも起り得て、ゲル中での上方シフトを誘起する。反復単位の後側のリン酸化の方がシフトは大きい。AT8抗体は非リン酸化型のいずれをも(期待されたように)認識しない。リン酸化後これはコンストラクトK17(図4b、レーン6)とのみ反応し、K10ともK3Mとも反応しない(図4b、レーン4および8)。言いかえれば、K17はエピトープを保持しているがK10およびK3Mはこれを失った。図3を参照することによって、エピトープは偽反復(pseudo-repeats)領域にも、これまでにCaMキナーゼサイトが見つかっているC-末端尾部にもなく(K10およびK19に反応性がないために)、むしろS198とT220(図3、ペプチドP)の間、すなわち、タウの“アセンブリー”ドメインのおもなキモトリップシン切断サイトの後の領域(Y197のうしろ)にあるべきであることが結論される。

【0090】次いで、放射性標識をおこなった、内部4反復単位をもつイソフォーム(Goedert et al., 1989, 前出)、h_{tau} 34の、トリプシンによる全消化を行った。生じたペプチドはHPLCにより分離し、配列決定をおこなった。そのうちの一つが注目する領域S195-R209にあった(図5)。このペプチドはS199およびS202に2つのリン酸をもっていた。ともに後に続くのはプロリンであり、抽出物中に存在する活性ある酵素はプロリン依存キナーゼであることを示唆している。

【0091】これらの結果は、リン酸化感受性のAT8エピトープが残基200の近傍にあるらしいことを示唆する。これはS199およびS202がともにDに変えられたh_{tau} 22の変異体(N末端挿入部なし、3反復単位)をつくることによって検証した。この選択を行なったのは、この残基でのキナーゼによるリン酸化を排除するためと、マイナス電荷を与えることによって、リン酸化の状態に近い状態をつくりだす。SDSゲル上、この変異体は高いMへのわずかな上方シフトをみせた(図6、レーン4)。イムノプロットは親タンパクh_{tau} 23のみがリン酸化後に抗体と反応する(図6、レーン6)が、リン酸化されていないh_{tau} 23(期待されるごとく)とも、リン酸化の有無に拘らず変異体とも反応しない(レーン7, 8)ことを示している。

【0092】AT8のエピトープはS199-S202の領域中に存在すること、およびこれがこれら2つのセリンのリン酸化に依存していることが結論される。これらは脳抽出物中に存在するプロリン依存キナーゼによってリン酸化され得て、これがこのタンパクをアルツハイマー様の状態に変える。この領域はこれまでに知られているあ

らゆる変異体タウに完全に保持されており、なぜすべてがリン酸化および抗体に対して同じように反応するかを説明している。

実施例5 プロテインキナーゼ活性の特性決定

タウタンパクのリン酸化はつぎのように行なった。タウタンパク (0.5mg/ml) を 2mM MgCl₂、1mM DTT、5mM EGTA、1.5mM PMSF、2mM ATP、20μg/ml プロテアーゼ阻害剤混合物 (ペプチド、ロイペプチド、アルファマクログロブリン、アプロチニン) を含む40mMのHEPES 中、1mMのオカダ酸の存在または非存在下で、脳の抽出物と36°Cでさまざまな時間 (24時間まで) インキュベートした。その後500mMのDTTを加え反応液を10分間煮沸し、15000gで15分4°Cで遠心した。上清をリアセントリーバッファー (RB, 100mM Na-PIPES pH6.9、1mM EGTA、1mM GTP、1mM MgSO₄、1mM DTT) に対して透析し、結合実験に用いた。

【0093】放射性標識化は10mCi/ml、3000Ci/mmolのガンマ-[³²P]ATP (NEN Dupont) を用いておこない、SDSゲルのオートラジオグラフィーのためには15-30Ci/molに希釈した。タンパクへのりんのとり込みはつぎのようにおこなった。1μgのリン酸化タンパクをSDS-ゲルにかけ、バンドを切り出してセレンコフモードを用いてシンチレーションカウンターで計測した。カウンターは既知の³²P標品 (セレンコフモードで検出効率約50%) によってキャリブレート (補正) した。補正した値は、リン酸化反応に用いた放射性ATPの既知の比活性に基づいて、1モルのタウあたりのPiのモルに換算した。

【0094】このキナーゼについて特記すべき点は、これが3つのはっきり区別できるステージ (図7aおよびhtau 23については8a参照) にあるすべてのイソフォームのタウのMrをシフトさせることである。リン酸化反応の最初の2時間で、タウタンパクはMr0 = 48kDタンパクからMr1 が約52kDの、よりゆっくり移動する分子種へ変換される。この最初のステージが完了するとともに、約6.10時間で完了する第二のステージに入る (Mr2 = 54kD)。第三のステージの完了にはおよそ24時間かかり (Mr3 = 56kD)、その後はそれ以上のシフトは生じない。

【0095】最初のステージが続く間、タウのタブレットの各バンドはリン酸をとり込む (たとえばオカダ酸の存在下で30分間に1分子あたり約0.5Piのレベル、図7b、レーン4参照)。これは少なくとも2つのはっきり区別できるリン酸化のサイトがなければならぬことを意味し、1つはシフトをひき起こす原因となり ("シフトサイト"、上のバンド)、もう一つはMrに何も影響を与えない (下のバンド)。下のバンドは次第に消え、2時間経つとそれぞのタウ分子は2分子ずつのPiをもつ。言いかえると、上のバンドは他のサイトのリン酸化の如何にかかわらず、"シフトサイト"がリン酸化され

たタウ分子を含む一方、下のバンドはシフトサイトにリン酸化されていない分子種のみを含む。オカダ酸 (O A) の効果は主に下のバンドについてのみみられ、ホスファターゼはおもにノンシフトサイトに働くことを示している。これらの考察は最初のステージのリン酸化にあてはまる。第2ステージおよび第3ステージではさらにシフトが生ずるが、シフトサイトおよびノンシフト部位の詳細な分析は、バンドの位置が重なり合うために可能ではない。全体として、各ステージでさらに2つのリ

ン酸のとり込みが生じ得、htau 23については最大6、htau 34については7がとり込まれることになる。これらの数値はオカダ酸存在下で得られたものであり、その非存在下では通常約1-2Piの小さな値となる。精製したキナーゼを用いるとこの値は12-14Piとなる。

【0096】最初のステージで主なシフトが生ずることから、また大きなシフトがアルツハイマータウの特徴であることから、最初のステージのリン酸化がアルツハイマー状態をひき起こすと考えられる。これはアルツハイマー特異抗体を用いて、標準のイムノプロット法によつてたしかめることができた。図8aは上と同様のリン酸化実験を示すものであり (すべて10μM オカダ酸存在下)、図8bはアルツハイマーのもつれのリン酸化エピトープと反応するモノクローナル抗体SMI 34 (Sternberger et al. 前出) を用いたイムノプロットである。この抗体はキナーゼによってリン酸化された、バクテリアで発現させたタウを認識するが、第2ステージから先だけである。同様の挙動は調べた他のアルツハイマー特異抗体についてもみられた。これらの研究から得られる結果は、主なリン酸化依存性シフト (ステージ1) はアルツハイマー様の抗体反応を生ずるシフト (ステージ2、3) とははっきり区別できるということである。

実施例6 微小管結合実験におけるタウタンパク質
タウタンパクのリン酸化異常とアルツハイマー病との関連について、もう一つの興味ある点は、リン酸化がタウの微小管に対する親和性に影響を与えるかどうかということである。これは微小管結合実験によってしらべた。すなわち、PCチューブリンを37°Cで1mM GTPおよび20μMのタキソール存在下にインキュベートした。10分後、さまざまな濃度のタウタンパクを加え、さらに10分間インキュベートした。この懸濁液を43,000gで35分間、37°Cで遠心した。生じたペレットをCBバッファー (50mM PIPES、pH6.9、1mM EGTA、0.2mM MgCl₂、5mM DTT、500mM NaCl) に再懸濁化した。htau 23およびhtau 34の場合には、ペレットと上清は10分間煮沸し、43,000gで4°C、10分間再び遠心した (この工程は、これを行なわない場合にSDSゲル上でタウのイソフォームと重なり合ってしまうチューブリン成分をとり除く役目を果たす)。ペレットおよび上清 (それぞれ結合および遊離タウを含む) をSDS-PAGE (7-15%アクリルアミドの勾配) にかけ、クーマシープリリアントブルーR25

0で染色した。ゲルをEpson GT6000スキャナーを用いて400dpiでスキャンし、GelScan (G. Spieker, Aachen) のプログラムを用いてPC368ATで定量した。ゲル上のタンパク濃度はつねに直線性の範囲 (1.5 O.D.まで) にあつ *

$$\text{Taubound} = n [\text{Mt}] [\text{Taufree}] / (\text{Kd} + [\text{Taufree}]),$$

【0098】ここで解離定数Kdおよびダイマーあたりの結合サイトの数nは数値を代入して得られた。[Mt]は微小管へと重合化したチューブリンダイマーの濃度 (通常30μM) をあらわす。

【0099】完全にリン酸化したタンパク (ステージ3、24時間) については、2チューブリンダイマーあたり約1タウから、6チューブリンダイマーあたり1タウへと、htau 23の結合能力の劇的な低下がみられた。言葉をえれば、リン酸化していないタウは微小管上を密にかたく覆う一方、リン酸化タウは微小管表面を、あたかもこれがより広い張りをもつごとく、より疎に覆う。図9cはhtau 24を用いた同じ実験を示す。結果は同様である。すなわち、結合能力の3倍低下がみられる。htau 34などの4つの反復単位をもつタウのイソフォームは、リン酸化されていない状態で、とくに強く微小管に結合 (Kdおよそ1-2μM) する。

【0100】主な他のシフト (実施例5参照) が最初の2時間に生ずることから、どの残基が最初のステージでリン酸化されるか、またどのようにそれが微小管との結合に影響するかを見出すことは興味深い。さきに述べたように、この期間に約2つのリン酸がとり込まれ、その1つがMr0からMr1へのシフトの原因となる。図10は90分間のリン酸化の後のhtau 34の結合を示したものである。明らかに目につく結果は、限られたリン酸化が、十分なリン酸化と同程度に有効に、親和性を低下させることである。これは微小管への親和性の低下がアルツハイマー様の免疫反応性に先行することを意味する (図8)

【0101】90分後のトリプシン分解ペプチドの分析は、セリン202, 235, 404および262にリン酸をもつ、4つの放射活性のピークを示した。このうちの3つは反復領域ではなく、この領域をほとんど対称的にはさむ位置を占める (図11) SPサイトにある。4番目 (S262) は最初の反復単位の非SPサイトにある。S396がリン酸化された残基ではない点はとくに注目に値する。これはLee et al. (1991、前出) がさきにPHFから得たタウのS396 (XSPモチーフの中心) がリン酸化されていることを示している事実に照らすと意外である。したがってS396は、第2および第3ステージでのリン酸化の過程で、免疫反応性の獲得と平行しつつリン酸化されることになる筈である (図8b)。

【0102】どのサイトが最初のMrシフトの原因となるかを見出すために、常法にしたがって点変異を導入した。Ser404をAlaに変えると第一ステージでのMrシフト※50

*た。光学強度は検量線を用いて濃度に変換し、結合等式に用いた。

【0097】

【数1】

※は失なわれるが、Ser199, 202, 235または396が変異した場合にはシフトバンドの消失はない。これはSer404のリン酸化が図7aまたは8aの上のバンドに存在する1つのPiの説明となることを意味する。2時間目以降に存在する追加のおよそ1Piは、202, 235, 404のセリン間に分布する。

【0103】タウの“シフトサイト”S404の結果は明確であるが、微小管結合の低下の原因となる要素はもっと複雑である。S404-A変異体の微小管との結合は親のhtau 34の場合と似ている。90分のリン酸化後の化学量論量の低下は約2倍で、親分子についてみられる3倍よりも若干小さい。もしS404が微小管との結合能の低下をもたらすリン酸化の唯一の残基であるとすれば、この変異で低下することを我々は期待しないであろう。変異での低下がみられた事実は、他の要素もまた関与していることを意味している。これらの要素はおそらく、1より多いPiの、反復領域 (たとえば202, 235, 262) の前または始まりの部分にある他のサイトの1つまたはそれ以上のサイトへの取り込みと関係しているのであろう。しかし、これらの残基はそれ自体では親和性の完全な低下をもたらすものとはなりえない。事実、202または235における点変異は404の場合と同様の影響を示し、すなわち結合能の部分的な低下しかもたらさない。異なるリン酸化サイトは協調的に働き、新しいコンホーメーションを生みだすというのが一つの可能な説明である。

実施例7 ステージ特異的抗体によって決定されるリン酸化の経時的变化

リン酸化エピトープに対するニューロフィラメント特異的抗体SM I 31, SM I 34, SM I 35およびSM I 310と非リン酸化エピトープに対するSM I 33 [Sternberger et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 4274-4276] をタウタンパクのステージ特異的リン酸化を検出するために用いた。SM I 33はヒトの正常な脳のタウを認識する (図12, レーン1) が、脱リン酸化されない限りはPHFタウを認識しない (レーン4)。これは、SM I 33のエピトープがアルツハイマー状態では、正常な脳のタウでは生じていないような、ある種のリン酸化によって特異的にブロックされていることを示唆している。SM I 31およびSM I 34はともに、SM I 34とは相補的な反応をみせる。つまり、PHFタウのみが認識される (図12cおよび12d, レーン3) が、これが脱リン酸化された場合 (レーン4) にも、対照の正常なタウ (レーン1) の場合にも認識されない。

【0104】リン酸化の時間経過に従ってさまざまな抗

41

体をテストすると、SM I 33がリン酸化の第二ステージで反応性を失なうことが示される(図7)。

【0105】SM I 31抗体に対しては、非リン酸化タンパク(0時間)または、第一ステージ間には反応性が観察されないが、第二ステージでは反応性が徐々にあらわれ、第三ステージを通じて反応性が維持される。同様の時間経過が抗体SM I 34(図13cおよび図12dレーン3を比較せよ)、SM I 35、およびSM I 310(図13g, h)についてもみられる。比較のため、AT8(図13f)

、リン酸化感受性アルツハイマーもつれ(tangle)抗体(Binder et al., J. Cell. Biol. 101(1985), 1371-1379)、および脱リン酸化タウに対する抗体TAU 1を用いたプロットを示した。AT8はSM I 31、SM I 34、SM I 35およびSM I 310と同様に反応する一方、TAU 1の反応のしかたはSM I 33に似ている。プロットで著しく目につく点は、それぞれの場合に於て抗体との反応性を決定するのは、ステージ2のリン酸化だということである。

【0106】これらの実験結果は、抗体が脱リン酸化またはリン酸化した形をとっているタウの同一の領域と反応すると仮定することによって説明しうるが、この仮定は後に示すように単純に過ぎる。他の2つの点を指摘しなければならない。1つは最大のゲルシフト(ステージ1)がアルツハイマー様の免疫反応性(ステージ2で現れる)を起こすものではないことである。すなわち、アルツハイマー状態ではつねにゲルシフトを示すとはいへ、タウのすべてのゲルシフトはアルツハイマー状態の診断的特徴とはならない。第2に、ゲルシフト、リン酸化、およびいくつかの異なる抗体との免疫反応性の間には驚くほど正確な関係があることである。

【0107】ニューロフィラメントのおもなリン酸化モチーフは、Sがリン酸の受容体である、KSPVのタイプの反復配列である(たとえばGeisler et al., FEBS Lett. 221(1987) 403-407参照)。タウはS396を中心としてそのようなモチーフを1つもち、またS235を中心とするもう1つのKSPモチーフをもつ。2つのKSPサイトは反復領域の一方の側にあり、タウのすべてのイソフォームで保持されている。類推によってこれらのサイトはニューロフィラメントに対してつくられたSM I抗体との反応に関与していることが想像されるであろう。我々はこれを、セリンの1つまたは2つを変異させること、より小さなタウのコンストラクトを作ること、トリプシン消化ペプチドの直接の配列決定を行うことという3つの方法で検証した。

【0108】K10、K17およびK19のコンストラクトを、キナーゼによるリン酸化の前後でしらべた(図14a)。K10およびK17はMrシフトを示したがK19は示さなかった。本実験ではK10およびK17の高いMr型への変換はごく一部に限られており、リン酸化の効率は良くなかったことに注意すべきである。K10は3つのシフトし

42

Mrバンドをもち、C末端領域には3つのリン酸化サイトがあることを示す。K17のシフトバンドはただ1つであり、反復領域前の領域にただ1つのシフト惹起サイトしかもたないことになる。図14b-dはSM I 33、SM I 31およびSM I 34によるイムノプロットを示す。SM I 35およびSM I 310に対するデータはSM I 31の場合と同様である(図示せず)。抗体SM I 33は脱リン酸化した状態のK17とのみ反応し、K10およびK19とは反応しない(図14、レーン3)。このことは、このエピトープは他のコンストラクトに含まれる配列の外側で反復領域の前方、S198とQ244の領域にあることを示唆する。これはエピトープが最初のKSPにあることと一致をみせる。抗体SM I 31はリン酸化型のK10と反応するが、K17ともK19とも反応しない(図14)。さきに用いたものと同じ論法によって、このエピトープはT373-L441の領域にあることになり、第2のKSPサイトと一致をみせる。最後にSM I 34はhtau 23、K10およびK17をラベルするが、K19をラベルしない(図14c)。後者の性質は反復領域がエピトープであるということに反するが、K10およびK17と反応する能力を保つことは互いに相容れない。我々の解説は、SM I 34は反復領域の両側の末尾に依存し、少なくとも一方の末尾が存在するときにだけ完全に安定化されるようになる、コンホーメーション的なエピトープをもつというものである。しかし、おののの場合におけるリン酸化に対する依存性は完全な分子の場合と同一である。

【0109】2つのKSPモチーフがキナーゼでリン酸化されることが考えられるので、この直接の証明を試みた。放射性標識したhtau 34のトリプシン消化ペプチドをHPLCで同定し、タンパクの配列とリン酸化残基を決定した。この領域には2つの主なリン酸化したトリプシン消化ペプチドがある。それはS235がリン酸化した、第1のKSPモチーフを含むペプチド1(T231-K240, TPPKSpPSSAK)と、S396とS404がリン酸化した、第2のKSPモチーフを含むペプチド2(T386-R406, TDHGAEIVYKSpPVVSGDTSpPR)である。さきに発表されているCαMキナーゼの唯一のリン酸化サイト、S416(Steiner et al., EMBO J. 9(1990), 3539-3544, htau 23の以前に用いられた番号づけではS405)はここで用いられたキナーゼによってはリン酸化されない。

【0110】次いでリン酸化残基235および396(図15)の点変異を行い、ゲルシフトおよび抗体との反応性を解析した(図16)。親タンパクhtau 40とそのKAP変異体はほぼ同一のMr値をもち、リン酸化後のシフト量も同一である(図16、レーン1-8)。S235がAに変異したときに、SM I 33の反応性は著しく低下し(図16、レーン3, 7)、リン酸化ののちに完全に消失する(図16、レーン2, 4, 6, 8)。これはSM I 33のエピトープが第1のKSPサイトのあたりにあるが、他のサイトでのリン酸化も影響をもつ(おそらくコンホーメーショ

ンを介して) ことも意味する。S396 (第2のKSPサイト) の変異はSMI33の結合にたいして認めるべき影響を及ぼさない (図16b、レーン5, 6)。

【0111】上に述べたように、SMI31のエピトープは反復領域の後のサイトのリン酸化に依存している。S396 がAla に変異したときに、抗体は依然としてリン酸化に依存した様式で反応するので、このセリンはそれ自体ではエピトープには関与しない (図16c、レーン6)。

S404 のAla への変異も同じ結果を生む。しかし、両方のセリンを変異した場合にはリン酸化によって抗体は反応するに至らない (データ示さず)。このことはエピトープが2つのリン酸化セリンを含むことを意味する。この抗体の結合には立体構造上の成分が関与する。1つだけの反復単位 (K13-K15) をもつコンストラクトは抗体に認識されない (図17、レーン10, 12, 14)。

【0112】SMI34は、その反応性が反復領域の前後のリン酸化サイトに依存しているためにもっとも複雑な挙動を示す。この抗体はすべてのKAP変異体を認識するので、S235 およびS396 は大きな役割を果たすことができない。しかし、SMI34がリン酸化K17, K10を認識するがK19を認識しない事実 (図17) は、反復の前および/または後の領域は、エピトープの形成のために反復領域と協同して働くかなければならないことを示唆

する。ひとつは可能性はエピトープが切れ目なく連続したものではなく、別の可能性は反復単位の数とコンホーメーションによるかもしれないということであろう。これらの可能性を検証するために、異なる組合せの2つの反復単位をもつコンストラクト (K5, K6, K7、図18)、および1つだけの反復単位をもつコンストラクト (K13, K14, K15) を得た。これらのすべてはリン酸化によってシフトを示し、またすべてがSMI34によって認識された (第3の反復単位を欠く場合、反応の程度は弱くなり、この反復単位がコンホーメーションにはとくに重要であることを示す、図17、レーン6)。これは、SMI34のエピトープが反復単位の数には依存しないことを意味する。しかし、反復領域の直前の領域の性質が重要であり、とくに電荷の影響をうけやすい。これは電荷をもった配列が反復領域の近傍に導入され、SMI34との反応性を失なうに至ったK2またはK3Mのようなコンストラクトから推論される。言葉を換えれば、電荷をもった配列はリン酸化自体とは独立にエピトープをマスクする能力をもつように見える (図17、レーン2, 4)。コンストラクトと抗体の間の相互作用を表1にまとめた。

【0113】

【表1】

45

46

リン酸化または非リン酸化状態 (+または-) タウ構築物と抗体との相互作用

イノムプロットの発色を×(非常に弱い)から×××(非常に強い)で表わした。

構築物	リン酸化 +/-	SMI33	SMI31	SMI34
htau40	-	×××		
	+		×××	×××
htau23	-	×××		
	+		×××	×××
K 3 M	-			
	+		(x)	
K 2	-			
	+		×××	
K 17	-	×××		
	+			××
K 10	-			
	+		×××	×××
K 19	-			
	+			
htau40/A235	-	(x)		
	+		×××	×××
htau40/A396	-	×××		
	+		××	×××
htau40/A235/A396	-	(x)		
	+		××	×××
htau23/A404	-	×××		
	+		×××	×××
htau23/A396/A404	-	×××		
	+			×××
K 4	-	×××		
	+			××
K 5	-	×××		
	+		××	×××
K 5	-	×××		
	+		××	×××
K 7	-	×××		
	+		×	××
K 13	-	×××		
	+			××
K 14	-	×××		
	+			××
K 15	-	×××		
	+			××

【0114】実施例8

タウコンストラクトのクローニングと発現：プラスミドの調製とクローニングの手順は、Sambrook et al. に従って行った。PCR增幅はメーカー指定の条件に従い (Perkin Elmer Cetus) TaqポリメラーゼおよびDNA THERMO-SERVOBLOCK (Biometra) を用いて行った。

【0115】タウcDNAクローンとそのコンストラクトは発現ベクターpNG2 (pET-3bの誘導体、Studier et al. 当研究室に於て、tau クローンの操作の便宜のためにPst I, HindIII, Nhe I およびEcoRV制限サイトを除去するという変更をおこなった)、または発現ベクターpET-3aにサブクローニングを行った。発現のためには、BL21 (DE3) E.coli系を用いた。

* (Studier et al.)。すべての残基番号はヒトのイソフォームで最大のhtau 40(441残基、Goedert et al.) のものを用いた。コンストラクトの単離のためにはタンパクの熱安定性を用いた。コンストラクトはFPLC Mono S (Pharmacia) クロマトグラフィー (詳細はHagedorff et al. 参照) によって分離した。

T8R-1の構築：これは8反復単位をもつタウの誘導体である。これはウシのイソフォームタウ (Himmler et al.) をもとにしてつくられた。2つのプラスミド、pET Nde 4B-12 (btau 4 遺伝子を含む) およびpET-KO (おもに4反復単位とベクター由来のリーディング配列および付随配列より成るKOを含む、Steiner et al.) をT8R-1の構築のために用いた。btau 4 由来の Nde I - Rsa I DNA断片を、KOの修復したXba I

-BamHI断片とつないで、15アミノ酸より成るキメラ分子をつくる。T8R-1遺伝子はMet1-Val393を人工的に導入したセリン残基を介してGly248-Tyr394タウ断片とつなぎ、バクテリオファージT7配列由来の23残基の末尾部がこれにつづく配列をコードする(htau 40の残基番号づけ)。

T7R-2およびT8R-2の構築：T7R-2は7反復単位、T8R-2は8反復単位を含むタウの誘導体である。いざれの分子もヒトのイソフォームhtau23およびhtau 24 (Goedert et al.)をもとに構築した。T7R-2およびT8R-2分子の操作のために、PCR反復カセットA1 (4反復単位をコードする)、A2 (4反復配列およびその後のタウ配列を含む、tau 24分子の全カルボキシ側部分をコードする)、A3 (3反復単位をコードする)を調製した。T8R-2分子はA1およびA2をhtau 23から単離したNde I-Pst I DNA断片と結び付けてつくった。このタウ誘導体は511アミノ酸より成り、htau 24のN末端の最初の311残基(Met1-Lys369、4反復単位を含む)にGly-Thr連続が続き、次いでhtau 24のC末端の198残基(Gln244-Leu441、さらに4反復単位)が続く。T7R-2遺伝子は、A1カセットの代りにA3カセットを用いた点を除けばT8R-2と同様につくられた。T7R-2タンパクは480アミノ酸より成り、htau 23のN末端の最初の280残基(Met1-Lys369、3反復単位を含む)にGly-Thr連続が続き、htau 24のC末端の198残基(Gln244-Leu441、4反復単位を含む、htau 40の残基番号づけ)が続く。

実施例9 タウタンパクのコンホーメーションとそのより高次の構造

a タウコンストラクトのコンホーメーションと二量体化

図19はこの実施例で用いたコンストラクトのタイプを示している。3タイプの分子を用いた。(1) htau 23(最小のイソフォーム、352残基)からhtau 40(最大のイソフォーム、4413残基、Goedert et al.参照)にまたがる、脳に存在するイソフォームのタウ。これらは主としてC末端領域の内部反復単位の数(3または4)およびN末端近傍の挿入の数(0、1または2)に違いをもつ。内部反復単位は微小管との結合およびPHFの形成に関与している。したがって、反復領域の構造にたいする情報を生むことが期待されるコンストラクトに注意の焦点が当たられる。(2) 反復単位数が、たとえば7、8に増加した(T7、T8)、遺伝子操作によるコンストラクト。(3) 基本的に反復単位を1つだけ(たとえばK11、K12)もつようなコンストラクト。

【0116】図20のSDSゲルはこのようなタンパクのいくつかを示している。大多数のタウコンストラクトはその実際の分子量から期待されるよりも大きなMr値をもつ(図20a)。目立つ特徴はダイマーおよびオリゴマー

を形成する傾向をもつことである。これは必ず種のコンストラクト、たとえばK12について特に顯著である(図20b)、ダイマーの形成はタンパクをある時間放置することによってすでに観察される(図20b、レーン2)が、これはおそらくダイマーがジスルフィド架橋によって固定されることによると考えられ、DTTによってこの現象は阻害される(レーン1)。これを検証するため、とくにシステインを重点的に架橋する架橋剤PDMを用いた。これはDTTを用いなかった場合と基本的に同じ産物を生成した(レーン3)。コンストラクトK12(2-5mg/ml)に対する化学的架橋化の実験を、0.5mM DTTを含む40mMのHEPES(pH7.5)中で37°C30分間インキュベートし、次いでDMSO中のPDM(signa)またはMBS(Pierce)の新鮮なストック溶液からえた0.7mMのPDMまたは1.5mMのMBSと室温で30分間反応させる。反応は5mM DTTまたは5mMのDTTおよび5mMのエタノールアミンをそれぞれ加えることによって停止させる。最終的に、システインとリジンを結びつけるMBSによってダイマーおよびさらにオリゴマーが形成される(レーン4)。架橋された分子種は、Superose 12カラムのクロマトグラフィーで分離でき(図20c)。ダイマーの均一な集団についての研究を可能にさせる。この目的のために共有結合で架橋されたダイマーはモノマーから、Pharmacia Superose 12 FPLCカラムを用い、これを0.5M NaSCN、0.5M LiClおよび2mM DTTを含む50mM Tris-HCl pH7.6で平衡し、0.3ml/mlの流速で溶出することによって分離された。カラムのフラクションはアルルし、セントリコン3ミクロコンセントレーター(Amicon)で遠心することによって濃縮し、SDS-PAGEで分析した。カラムはPharmacia低分子量ゲルろ過キャリブレーションキットを用いてタンパクのキャリブレーションを行った。キャリブレーションタンパクの有効水和ストークス半径(r)はキットの説明書からとり、分配係数(σ)は溶出容積から求め、等式 $\sigma = -A \log r + B$ にあてはめ、それによってタウコンストラクトのモノマーおよびダイマーに対するストークス半径が得られる。軸比はペリン(Perrin)の方法にしたがって計算した(詳細についてはCantor & Schimmel, Biophysical chemistry, Part II: Techniques for the study of biological structure and function. Freeman & Co, San Francisco, 1980参照)。溶出プロファイル(elution profile)(図20d)はK12のモノマーに対してはストークス半径25nmを、ダイマーに対しては30nmを与える。分子量は13および26kDをそれぞれ与えると、軸比は10および8が得られ、電子顕微鏡で観察される桿状の形状と一致をみせる(同じ長さの長大円体では実際より低く見積る6.8および8.5nmとなる:後出)。

【0117】他のタウ種は同様の架橋結果を示すが、それらはつきの理由によって多少より複雑である。タウはシステインの反復単位2および3のみにもっている(Cy

s 291 および Cys 322 残基)。反復単位 2 は、たとえば h tau 23 またはコンストラクト K12 のように、ある種のイソフォームでは欠いており、これらはただひとつ、Cys 322 のみをもつ。PDM のような Cys-Cys 架橋剤を用いると、これらの分子はダイマーのみを形成し、それ以上大きな集合体を形成しない (図 20b、レーン 3)。これとは対照的に、2 つのシステインをもつ 2 個の分子 (たとえば h tau 40, K11) は分子内架橋、ダイマーおよびより高次の集合体、オリゴマーを形成することができる。この多様性は、タウには多くのリジンが含まれるために、K12 を MSB で架橋化したときにみられるもの (図 20b、レーン 4) と似ている。

【0118】いくつかのタウコンストラクトの溶液中のコンホーメーションを、常法の分析超遠心および CD 分光分析によって調べた。たとえば、h tau 40 の沈降恒数 2.6 S が、脳からのタウ混合物を用いて得られた。h tau 40 の分子量 (45.8kDa) をもつ球状の粒子については沈降恒数は約 4.2 S であることが期待される。低い実測値は h tau 40 は、流体力学的軸比約 15 をもつ、ひき伸ばされた構造をもつことを示している。h tau 40 コンストラクト K12 の CD スペクトル (図 20e) は区別がつかない。どちらも 2 次的な構造をほとんど示さない。このことはタウの N 末端、C 末端領域のいずれもが、 α ヘリックスまたは β シートなどの内的な規則性を欠いていることを意味する。

b 合成 PHF

脳組織から分離されたタウは纖維状の構造に自己集合することができる (たとえば Montejo de Garcini & Avila, J. Biochem. 102 (1987), 1415-1421; Lichtenberg-Kraag & Mandelkow, J. Struct. Biol. 105 (1990) 46-53 参照)。この性質は、タウがアルツハイマー病の神経原線維変化の主成分の一つであるという事実に照らして特に興味がある。初期の研究において、*in vitro* で生じたフィラメントとアルツハイマー-PHF との関係は、とくにこのタンパクが不均一であることから、いまだにはっきりしていない。したがって粗換えタウコンストラクトが自己集合の能力をもつかどうかを調べることが望まれた。これは pH、塩、バッファーの種類、等の条件をさまざまに変えた上で行った。代表例をあげると、タウコンストラクトまたは化学架橋をおこなったダイマーを、さまざまなバッファー (たとえば約 50-500 mM MES, Tris-HCl, Tris-マレエート, pH 値 5-9, 5-30 mM MgCl₂, CaCl₂, AlCl₃) に対し、4°C で 12-14 時間透析を行った。溶液を短時間遠心し (Heraeus Biofuge A, 10,000 g 1 分)、ペレットを 4°C で数日保存したのちこれをネガティブ染色 (2% ウラニルアセテートまたは 1% ホスホタングステン酸) 電子顕微鏡標品にした。あるいは溶液を Van Bruggen et al., J. Microsc. 141 (1986), 11-20 の方法にしたがって金格子上での格子透析 (grid dialysis) のために用いた。調べたコンストラクトのうち、

K11 と K12 のみが PHF と似たフィラメントをつくった。至適条件は 0.3-0.5 M Tris-HCl, pH 5.0-5.5 および何も塩を添加しないものだった。K12 コンストラクトについて得られた結果を図 21 に示した。pH 範囲 5.5-5.9 では盛んなフィラメント形成があった。その長さはさまざまだったが、200-1000 nm のものが多かった。大部分は滑らかな形状を示したが、他は軸方向に沿って約 70-75 nm の周期で (矢印) 規則的な太さの変化があった。最小の直径は約 8 nm で最大は約 15 nm だった。短かい、ほぼ 80-150 nm の長さの桿状の粒子も同時に観察され、これはちょうどフィラメントの 1 つまたは 2 つの交差周期を表わす (図 21, 中央) ものとみられた。タンパクサブユニットの配置を示してくれる軸方向の微細構造については信頼性をもって見分けることはできなかった。したがって、これはネガティブ染色の解像力の限界以下であり、および/またはコントラストが欠けていることを示す。概してフィラメントは互いに親和性をもつが如く、束になって集団となる (図 21a)。類似の PHF 様のフィラメントは PDM で架橋化を行った K12 ダイマーについてもみられる (図 22)。これはダイマーはフィラメント形成の中間段階である可能性を示すものである。これらの多くの特徴は、比較のために図 23 に示した、アルツハイマー病の脳から分離した PHF の特徴に似ている。この出現はある程度分離の手続きに左右される。図 5a は Wischik et al., J. Cell. Biol. 100 (1985), 1905-1912 の方法に従って神経原線維変化から調製した「不溶性」フィラメントを示す。これらのフィラメントは長く、直線的で、はっきりした約 75 nm の反復単位があるという特徴をもつ、均一の超微細構造をもつ。30 対照的に、このフィラメントを Greenberg & Davies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1990), 5827-5831 の方法に従ってサルコシルで「可溶化」すると、これはより短く、より不均一である (図 23b)。とくにこの標品は非常に短かい粒子 (約 1-2 交差周期に対応する長さ) および捩れた外観をもたない (直線的なフィラメントの名残り) 滑らかなフィラメントとを含んでいる。反復領域についての合成 PHF (たとえば K11, K12, K12 ダイマー、図 21, 22) と、アルツハイマー脳の可溶画分の PHF との間には 3 つの基準に照らして驚くべき類似性が認められる。() フィラメントは図 23a の不溶性 PHF よりも短かい。() これらは周期性がより不均一で、あるものは捩れた外観をまったくもたない (直線的なフィラメント)。() これらは 1 交差周期にまで及ぶ、きわめて短かい桿状の粒子を含む。

【0119】これまでのところ、合成 PHF 様の纖維は、基本的に反復領域 (3 または 4 反復単位図 19) を含む K12 および K11 のようなコンストラクトのみについて観察されているが、より大きなタウのイソフォームには観察されていない。これらのデータはすべて、リート 50 領域がアルツハイマー神経原線維変化のものに酷似した

51

PHFへと自己集合する能力をもつ基本単位であるという仮定と一致をみせる。これはまた、アルツハイマー-PHFのプロナーゼ耐性のコア部分が反復領域を含むという、いくつかの研究室での実験結果（たとえば Goedert et al. 前出、Jakes et al., EMBO J. 10(1991), 2725-2729）とも一致する。またフィラメント形成コンストラクトはリン酸化されず、真のアルツハイマーのPHFの場合とはちがって、これは自己集合に役割を果たしていないことが言える。

c タウモノマーとダイマーの電子顕微鏡観察

合成PHFを用いた結果は、反復領域はタウ分子の相互作用に特別の役割をもつことを示した。したがって、異なるコンストラクトの性質を、電子顕微鏡を用いてより詳しく明らかにすることが望まれた。選んだ方法は、グリセロールスプレーと結びつけた。きわめて低角度の金属シャドウイングである。この方法はこれなしにはコントラストが小さくて見ることのできない粒子を見るよ*

さまざまなタウ構築物の長さの要約

構築物	長さ(nm)	標準偏差(nm)	数
htau23	35	7	232
T 8 R-1	58	15	304
T 8 R-2	61	17	75
T 7 R-2	60	16	73
K 11	26	5	32
K 11 ダイマー	32	6	24
K 12	25	4	27
K 12 ダイマー	30	4	25
K 12 PDM ダイマー	29	6	79
K 12 MBS ダイマー	34	6	85

【0122】この値はHirokawa et al. J. Cell. Biol. 107(1988), 1449-1459 によって報告されたものより小さいが、これは実験方法の違いに由来するものかもしれない（凍結に対してグリセロールスプレー、すべてのイソフォームの混合物に対して最小のイソフォーム）の金属シャドーをかけたhtau 23分子の見かけ上の幅は約3-5nmであり、コントラストは小さく、対照サンプル（1重および2重鎖DNA、 α -ヘリックスのタンパク）よりも小さい。電子顕微鏡写真を詳しく検討すると、コントラストが高まっていて、若干大きな直径（5-7nm）をもち、2つの部分に開裂している場合があり、長さがモノマー（約40nm）と同様あるいはわずかに長い粒子の集団があることがわかる。これらの粒子はダイマーを形成している、（ほぼ）並置したモノマーである（図24b）として説明され、これは架橋化ダイマーおよび後述する抗体修飾の結果と一致する。

【0123】明らかにコンストラクトT 8 R-1について※50

52

*うにする。スプレーは Tyler & Branton, J. Ultrastru et. Res. 71(1980), 95-102 の方法に従って行った。試料をスプレー・バッファー（50mM アンモニウムアセテート pH8.0, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0.1mM EGTA）を用いて1:10に希釈し、これを70%グリセロール溶液にして雲母の新鮮な割断面上に噴霧する。噴霧された標本は2時間真空乾燥し、BAE O80Tシャドウイングユニット（Balzers Union）を用いて白金／炭素（厚さ約15nm、シャドウイング角度4°）、続いて20-30nm炭素でシャ

ドウイングを行う。最後にレプリカは2度蒸溜した水に浮かせて捨てあげ、600メッシュの銅格子（copper grids）で上にすくいとる。

【0120】htau 23分子（352残基、図24a）は桿状で、平均の長さ35±7nmをもつ（長さは表2および図25にまとめた）。

【0121】

【表2】

※では長い粒子が得られ、その平均の長さは58±15nmで、htau 23よりも23nm長い（図24c, 25b）。このコンストラクトは8反復単位（基本的な4反復単位の重複、図19）をもち、htau 23よりも5反復単位多く、これに加えてN末端近傍に2つの29-merの挿入がある。T 8 R-2はN末端の挿入をもたないにも拘らず、同様の長さ（61±17nm）をもつ。コンストラクトT 7 R-2も、反復単位が7つ（3+4）だけであるのとN末端の挿入がないのに拘らず、同様の長さ、60±16nmをもつ。一見これらの結果は辻褄が合わないように見える。しかし、より大きなコンストラクトはより長くなる一方で配列のある部分は長さに影響を与えない。以下の結果を予想することによって、この矛盾は統一的な仮説によって説明することができる。すなわちタウコンストラクトの長さは主として反復領域によって決定される。これに対してN-末端領域およびC末端尾は大きな影響を与えない。

40

反復領域それ自体は長さが第2の反復単位とはほぼ関係

なしに決まる、だいたい20-25nmの一つの単位と考えるべきである。この仮説はN末端の挿入は長さにはごくわずかの影響しか与えないことを内容として含む。それは3または4反復単位をもつコンストラクトはほぼ同一の長さをもつこと(たとえばT7R対T8R)、および1反復領域の追加は20-25nmの長さの増加をもたらすこと(htau 23対T7RまたはV8Rの場合のように)を予測する。

【0124】T8Rおよび他のコンストラクトはまたあたかも2つの“単位”(この場合それぞれ4反復単位)が相互作用すること、ヘアピン型(図24d)に巻きこんだ粒子を形成する。これは逆平行的な配置をとっていることを示唆し、以下に示す抗体のデータを支持する。幅およびコンストラクトがhtau 23に類似のダイマーであることを物語るT8R粒子もまた観察された(図24e)。

【0125】既述の場合のように、上に述べた(図26)K11およびK12によって形成されるPHF様の纖維を形成する、反復領域コンストラクトは桿状である。厚さまたはコントラスト、およびダイマーとの比較という基準を用いると、K11は平均の長さ 26 ± 5 nmのコントラストの低いモノマー集団と、約 32 ± 6 nm(図26b)のよりコントラストのはっきりとしたダイマー集団をみせる。これは2つの分子がほぼその全体の長さに沿って並び合っていることを意味している。K12については、 25 ± 4 nmのモノマー(図26d)、約 30 ± 4 nmのダイマー(図26e)が見出される。モノマーは、残基数が3分の1であるのに拘らず、長さはhtau 23の70-75%である(図25c, e)。どちらのコンストラクトもより長い粒子が見出され、これらは会合してテトラマーとなったダイマーであるとして説明される(図26c, f)。

【0126】これまで、モノマーと、ダイマーの分類は粒子の幅とコントラストをモデル構造と比較することによって判断した。しかし、共有結合で架橋したダイマーをゲルクロマトグラフィーで単離し、これを電子顕微鏡その他の方法で直接に研究することが可能である。一例として、ただ一つのCys 322を介してPDMによって架橋したK12のダイマーを示した(図27a)。電子顕微鏡下では、そのコントラストは上に述べたダイマーと似ている。しかしもっと重要な点は、これらはモノマーよりもほんの僅かしか長くないということである(29 ± 6 nm、図27a、図25e, g)。これはPDMダイマーがほとんど重なり合って並ぶ2分子から形成されることを意味する。MBSによって誘導されるK12のダイマー(34 ± 6 nm)もまた、これがおそらくさまざまな種類のCys-Lys結合が形成される可能性があるところから、PDMについて得られるものよりも若干長くなる傾向をもつ(5nmほど)点を除けば、似ている。

【0127】これらをつき合わせると、K11およびK12(および反復領域を必ず含む他のコンストラクト)から

得られた結果は、反復領域は、それが3または4反復単位をもつかどうかとは無関係に、ほぼ均一な長さの折畳み単位を形成するという仮説を支持している。

【0128】調べたすべてのコンストラクトについて、グリセロールスプレー実験は纖維状構造を形成するある種の傾向を示す。ほとんどの場合、その構造は直径がほぼ均一であり、PHFとはこれといって明らかな関係を示さない。はっきり別の自己集合の結果を生じたものであろう。

10 d ダイマーの逆平行配置

上のデータから、タウおよびそのコンストラクトは横に並んでダイマー化する傾向をもつことは明らかである。これは極性についての疑問を提出する。これら粒子は並行または逆平行のどちらなのであろうか。最初のヒントは8反復単位コンストラクト(たとえば(図24d))について観察されるヘアピン型の折畳みから得られ、これは構成する2分子が逆平行の配置をとっていることを示唆する。これに対する直接の証明は、エピトープが最後の反復単位にあり、したがって配列上C末端に近いモノクローナル抗体(Dingus et al., J. Biol. Chem. 266(1991), 18854-18860)によって標識することによって得られる。図28a(左)は1分子の抗体が結合したhtau 23の粒子を示す。抗体は一方の端の近くに結合し、桿状体の物理的な一端がC末端とおよそ一致していることを示す。観察される桿状部分の長さは抗体で標識されないhtau 23のそれと類似している。見かけの幅から言えればそれはモノマーあるいはダイマーでありうる。同じ視野中に2重に標識された粒子が見つかる(図28a右)。抗体は反対側に結合し、ダイマーの2つのサブユニットは逆の極性をもつことが証明される。

【0129】K12コンストラクトについても同一の像が得られる。すなわち、一端に抗体のついた桿状の突出部(図28b左)、およびダンブル(dumb bell)、つまり逆平行のダイマー(図28b中央)である。最後に2つの抗体と2つの突出部をもち、中央に捩れのある粒子(2つの“サクランボ”、図28b右)がみつかる。それぞれの腕の長さは一単位の突出部の長さと同じであるので、この粒子は図26cおよびfのテトラマーと同じものであるように思われる。中央でのダイマーの相互作用は、相互作用がなければ期待される抗体の結合を妨害しているとみられる。

【0130】K12コンストラクトのPDMダイマー(Cys 322-Cys 322架橋で形成される)を図28cに示す。1つの抗体で標識されたものを左、化学架橋したダイマーは逆平行のモノマーより成ることを示す、2個の抗体で標識されたものを中央にあげた。仮定のテトラマーは右に示す。MBS架橋のダイマーについても基本的に同じデータが得られた(Cys 322と近隣のLys、図28d)。

【0131】この実施例で述べた知識に基づいて、既に述べたように、アルツハイマーPHFの形成の低下また

55

は抑止に有効な薬剤を試験法が開発できる可能性があるよう、アルツハイマー-PHFの解消に有効な薬剤のin vitroの試験法を開発しうるであろう。

実施例10 タウタンパクのリン酸化に対する、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 (GSK-3) およびcdk2-サイクリンAの影響

実施例4および5に述べた実験をGSK3 (ホスファターゼ活性化因子FAとも呼ばれる。Vandenheede et al., J. Biol. Chem. 255 (1980) 11768-11774) をリン酸化酵素として用いて繰り返した。

【0132】GSK3 (イソフォーム α および β) をウシの脳から、2つのイソフォームを分離する Mono S クロマトグラフィーのステップを追加して、Vandenheede et al. 前出の方法に従って精製した。ここに述べた実験の大部分は、TSKビーズ上のGSK- α (Van Lint et al., Analyt. Biochem. 1993印刷による) の免疫沈澱を用いて行ったが β サブユニットを用いた対照実験も同様の挙動を示した。

【0133】GSK3のイソフォーム α および β に対するポリクローナルな抗ペプチド抗体を、ウサギを用いて得、ペプチドカラムの親和クロマトグラフィーによって精製した。GSK3の免疫沈澱は、20mM Tris-HCl, 1% NP-40, 1mM PMSF, 2 μ g/mlアプロチニン, 1 μ g/mlロイペプチドおよび0.2 μ g/mlのペプチド中のPC-12細胞質液から得た。100 μ lの細胞質液を1 μ lの α -または β -GSK抗体 (1mg/ml) または対照のウサギ抗体と4°Cで4時間インキュベートし、5 μ lのTSK-プロテインAビーズを加えてさらに1時間インキュベートを行い、最後にビーズを10mg/ml BSAを含む20mM Tris-HCl, 0.5M LiClを含むトリスバッファー、および10mM MgCl₂および1mM DTTを含む20mM HEPES pH 7.2で洗った。リン酸化の測定では、2 μ lのペレットを40mM HEPES pH 7.2, 10mM MgCl₂, 2mM ATP, 2mM EGTA, 0.5mM DTTおよび1mM PMSF中に溶かした基質 (3 μ M) の8 μ lとインキュベートを行った。

a GSK3によって誘導されるリン酸化の時間経過と抗体反応性

図29はGSK3によるhtau 40のリン酸化の時間経過、および対応するオートラジオグラムおよびイムノプロットを示す。多くの点で、示す挙動は脳のキナーゼ活性または精製したMAPキナーゼによって得られるものに似ている。すなわちリン酸化は3つの主なステージでゲルシフトをもたらす。ほぼ4Piをとり込む。抗体AT8、SMI34、SMI31との反応性をひきだすが、TAU1およびSMI33との反応性を低下させる。

b GSK3によるタウのリン酸化サト

おもなリン酸化サイトは抗体エピトープおよび点変異によって決定できる (図29)。TAU1はSer 199およびSer 202がリン酸化していないことを必要とし、AT8 50

56

はそのいずれもがリン酸化していることを必要とする。このために、どちらか一方のセリンがリン酸化されているときには、これらの抗体はいずれも反応しない。これは、Ser 199およびSer 202のいずれもがステージ2の間にリン酸化をうけることを意味する (図29、パネル3, 4)。同様に、抗体SM I 31はSer 396およびSer 404の両方のリン酸化を必要とし、これは、両セリンとともにすみやかにステージ1でリン酸化されることを意味する (図29、パネル6)。SM I 33はSer 235がリン酸化していない時の反応するので、反応性の漸次的な喪失はこの残基のリン酸化がごくゆっくりしたものであることを意味する (パネル7)。これらの残基を合計すると5Pi分となるが、オートラジオグラフィーで観察されるのは約4Piであり、これはこれらセリンのすべてが100%リン酸化されるものではないことを物語る。MAPキナーゼの場合にくらべると、免疫的な反応には時間経過において微妙な違いがある。たとえば、SM I 31の反応性はAT8およびSM I 34に先だって早く始まる一方、SM I 33の反応性は長い時間領域にわたって維持され、GSK3の反応様式はMAPキナーゼのそれとは同一ではないことを示している。

【0134】点変異を用いてさらに情報を得ることができる。実施例5および6に示したように、脳抽出液由来のキナーゼ活性およびMAPキナーゼによってひき起こされる最初の大きなシフトの変化は、Ser 404のリン酸化によっている。図30 (レーン1-3) に示されるようにGSK3についても同じことがいえる。Ser 404をAlaに変異させると、最初のすみやかなシフトは消失し、初期のリン酸化は低いレベルに低下する (図30、レーン2および3を比較せよ)。

【0135】イムノプロットからもう一つ結論されることは、Thr-Proにも働くMAPキナーゼとは違って、GSK3はSer-Proモチーフに対する選択性が強いことである。これは約4Piのとり込みがリン酸化されたエピトープを説明するのに必要であるところから言える。これを検証するために、すべての6つのSer-ProがAla-Proに置き換えた (図31、中) htau 23の誘導体、構築物AP11をつくった。AP11は1分子あたり<0.1Piという、ごく限られたリン酸化しか示さず、Thr-Proモチーフは大部分がリン酸化されていないままであることを確認できる。同じ結果はコンストラクトAP17 (すべての6つのSer-Proおよび8つのThr-ProがAla-Proによって置き換えた、図31、上) についても得られる。4反復単位のみを含むもう一つのコンストラクトK18 (図31、下) もまたリン酸化されず、微小管の結合領域内には大きなリン酸化サイトがないことを示す。かくして、GSK3およびMAPキナーゼはともにプロリン依存であるという点で似ているがMAPキナーゼはThr-Proモチーフについても活性がある。

c GSK3およびMAPキナーゼは微小管およびPH

Fと結合する。

【0136】タウが微小管結合タンパクであることを考えれば、タウをリン酸化するキナーゼもその近傍に局在していることが期待され得る。したがって、MAPキナーゼまたはGSK3が、会合と解離のサイクルを繰り返しを通して共精製されるというふつうの基準に照らして、微小管結合タンパクであるかどうかをしらべた。実際にその通りであった。図32bは、MAPキナーゼのイソフォームp42およびp44のいずれもがブタ脳の微小管と共に純化されることを示す。図32c, dはGSK3 α および β についても同様であることを示す。微小管結合MAPキナーゼは、Tyrがリン酸化されていない（イムノプロットによる。データ示さず）ことから、活性化されていない状態にあるのは興味深い。

【0137】この結果を考慮すると、キナーゼがアルツハイマー-PHFとも結合しているかどうかを検討するの興味ある問題である。図33aのイムノプロットは、GSK3は正常およびアルツハイマー脳にはほぼ等量存在しており、この点でMAPキナーゼの場合と似ている。さらに、キナーゼは、2つの異なる方法、Wischik et al. (J. Cell. Biol. 100(1985), 1905-1912(図33b、レーン1) および Wolozin et al., Science 232(1986), 648-650(レーン2)に従って単離したPHFと直接に共純化される。GSK3が微小管およびPHFと結合し、タウをリン酸化するという事実は、キナーゼがタウと微小管の相互作用に影響を与える可能性があることを示唆する。これはタウリン酸化の病的な効果についての一般的な考え方と一致するものであろう。驚くべきことに、結合に対する影響はなかった。図34はリン酸なし、およびGSK3および脳抽出物のキナーゼ活性によるリン酸のある条件で、h tau 23の微小管との結合を示す。後者の場合、親和性の強い減少がみられるが、GSK3自体による影響はごくわずかである。

d c d k 2-サイクリンAによるタウのリン酸化
プロテインキナーゼc d k 2-サイクリンA（プロリン依存ser/thrキナーゼ、Hunter前出参照）は、リン酸化、ゲルシフト、および抗体との反応性から判断すると、アルツハイマー様の状態をひき起こす。キナーゼc d k 2はh tau 40に35Piをとり込み、ゲル上でMAPキナーゼおよびGSK3と同様のシフトを生じさせる。抗体AT-8、SM131、SM134はリン酸化されたタウを認識するが、TAU-1およびSM133は認識せず、この点でもMAPキナーゼおよびGSK3と似ている。すべてのser-proモチーフ (Ser 199, 202, 235, 396, 405, 422) はある程度リン酸化される。図46参照。

【0138】調製法は次の通りである。c d k 2/サイクリンA複合体を過剰生産する細胞をボストンのDr. P. Iwnica Wormsから得た。

【0139】サイクリンAはグルタチオン-S-トランスフェラーゼと融合させた。このために複合体は下記に

50 MAPキナーゼによってつくりだすことができる事が示

概略を述べたように、グルタチオンアガロービーズを用いて容易に精製できる。

グルタチオンビーズにおけるキナーゼアッセイ
3×10⁶の細胞に、それぞれヒトp33^{cdk2}およびヒトサイクリンA（グルタチオン-S-トランスフェラーゼと融合した）の遺伝子をもつ2種類のウイルスを、それぞれm.o.i. 10で感染させた。感染40時間後、細胞をPBSで2度洗った。細胞はプレートのまま-70°Cで凍らせた。（細胞は実験を行うまで凍結保存した。）

10 細胞溶解液の調製

細胞を以下のバッファー1mlで溶解する：

50mM Tris pH 7.4；

250mM NaCl；

50mM NaF；

10mM NaPPi；

0.1% NP40；

10% グセロール；

プロテアーゼ阻害剤 (0.15ユニット/mlアロチニン、2mM PMSF、20μM ロイペプチド)。

20 【0140】プレートを4°Cで15分振らし、溶解液を集めエッペンドルフチューブに移して10Kで4°C10分間の遠心を行う。溶解液上清を新しいエンペンドルフチューブに移す。

グルタチオン沈澱

100μl(PBS中のアガロースの50%スラリー)のグルタチオンアガロース (Sigma)を溶解液上清に加え、4°Cで約1時間振動後軽く遠心してビーズのペレットを得る。ビーズを1mlの上記の溶解バッファーで2度洗い、次いで不完全キナーゼバッファー (50mM Tris pH 7.4、10mM MgCl₂) で2度洗う。最終洗浄後、ビーズより残留バッファーをできる限りとり除く。

30 キナーゼアッセイ
外部基質を加え、次いで下記完全キナーゼバッファーを加える：

50mM Tris pH 7.4；

10mM MgCl₂；

1mM DTT；

10μM 非標識ATP；

2μlのガンマ³²P-標識ATP (NEN: 3000Ci/mM)。

40 【0141】これを30°Cで適当な時間インキュベートする。

実施例11 タウタンパクSer 262の新しいキナーゼによるリン酸化とそのタウタンパクの微小管との結合に対する影響

これまでのところ、タウタンパクのアルツハイマー様の状態は、Ser-ProおよびThr-Proモチーフのリン酸化を含むこと、そしてこの状態はアルツハイマー特異抗体に対する反応からして脳の抽出物のキナーゼ活性およびMAPキナーゼによってつくりだすことができる事が示

されている。下記に示すように、タウの微小管への結合の調節の重大なステップは、脳抽出物のキナーゼ活性によってリン酸化をうけるが、MAPキナーゼによってはリン酸化をうけない残基、Ser 262 で起こる。この残基をリン酸化し、それによって微小管とタウタンパクの間の相互作用を強く減少させる、哺乳動物の脳から得られる新しいキナーゼをさらに精製する。

【0142】タウとタキソールで安定化した微小管の結合の研究は実施例6で述べたように行った。これはあらかじめ生じた微小管へのタウの結合の直接の測定値を与え、解離恒数と結合のストイキオメトリー (n =結合タウ/チューブリンダイマー) が得られる。ストイキオメトリーの低下がもっとも見やすい、再現性のよいパラメーターとなる。リン酸化に際しての野生型のイソフォームタウのストイキオメトリーの低下は、 $D_n, wt = (n_{unphos} - n_{phos})/wt$ を 100% として変異型 D_n, mut のリン酸化の影響と比較することができる。

【0143】脳からキナーゼの調製。250gのブタの脳組織の抽出物を調製し、この疏安沈澱を実施例2で述べたように行った。30%と45%飽和の間で得られた沈澱をバッファー1 (25mM NaCl、2mM EGTA、2mM DTT、1mM PMSF を含む25mM Tris-HCl pH 7.4) に均一に分散させ、このバッファー1 1に対し一夜透析した。透析バッファーの交換は2度行った。全タンパク質の濃度の決定にPierce BCAアッセイキットを用いて行った。透析した溶液の超遠心分離によって上清を得たのち、この一部、250mg タンパクまでをバッファー1で平衡させた Mono Q HR 10/10 カラム (Pharmacia)に搭載した。120ml のバッファー1中の25–500mM NaClの直線グラジェントを用い、2ml/分の流速で溶出した。各フラクションのリン酸化能を下記のバクテリアで発現させたタウおよびタウコンストラクトを用いて検定した。活性のあるピークフラクションをブールし、Centriprep 10 ミクロコンセントレーター (Amicon) を用いて遠心し、10–40倍濃縮し、50mM NaCl を含むバッファー1で平衡させた Superdex 75 HiLoad 16/60 サイズ排除カラム (Pharmacia) を用い、同じ溶液で溶出した。活性のあるフラクションをブールし、Mono Q HR 5/5 カラムを用い、30mlのバッファー1中の0–600mM のNaClのグラジェントによって、0.5ml/分の流速で再クロマトグラフィーを行った。活性フラクションをバッファー1に透析し、0°Cで貯蔵した。ゲルロ過カラムはPharmacia 低分子量マーカーセットで検量した。リン酸化アッセイは報告された方法 (Steiner et al. 1990 前出) で行った。

【0144】タウリン酸化のゲル内アッセイは Geahen et al., Anal. Biochem. 153(1986), 151–158 に従って行った。キナーゼ活性をもつ Mono Q フラクションを 11%SDS-PAGE (0.5mmの厚さのスラブゲル) にかけた。タウタンパクを重合化の直前に分離ゲルに加えた (最終濃度 0.1mg/ml)。続いて次の処置を行った。(1) SD

50 b)

Sを除くためにゲルを20%のプロパノールを含む50mM Tris-HCl pH 8.0を用い室温で30分間2度洗い、次いで5mM β-メルカプトエタノールを含む50mM Tris-HCl pH 8.0 (=バッファーA) でさらに室温で30分洗った。(2) 酵素を 6 M のグアニジン塩酸を 2 度交換して室温で 1 時間変性させた。(3) 酵素を 0.04% Tween40 を含むバッファーAを 5 回交換して 4°C で約 15 時間処理して復元した。(4) ATP を含まないリン酸化バッファー (40mM HEPES pH 7.5, 5mM EGTA, 3mM MgCl₂, 0.1mM PMSF, 2mM DTT) で室温で 30 分間プレインキュベートした。(5) 0.1mM ATP と 130Ci/Mol (ガンマ-³²P) ATP の添加によるリン酸化は、ゲルをプラスチックバックに封じ、37°C で 20 時間回転輪 (rotating wheel) でインキュベートすることによって行った。(6) 過剰の (ガンマ-³²P) ATP の除去。ゲルは 1% ピロリン酸ナトリウムを含む 5% TCA 300–500ml でインキュベートし、未結合の放射性が無視できるようになるまで、インキュベーションを 5 回くり返した。(7) 染色およびオートラジオグラフィーは常法に従っておこなった。

20 a) Ser 262 のリン酸化はタウの微小管への結合を強く低下させる。

【0145】実施例6で示されたように、タウタンパクを脳の抽出物のキナーゼ活性でリン酸化すると、ストイキオメトリーは典型的にダイマー–チューブリンあたり約 0.5 から約 0.1–0.15 へと、すなわち約 3–4 倍低下する。この例では野生型のタンパクへのこの影響を 100% とすることにする。リン酸化によって影響をうけるパラメーターは、はっきりとした時間経過をもつ。大きなゲルシフトは早く (約 2 時間までのステージ 1 のリン酸化) 起こり、これは Ser 404 (h tau 40 の番号づけ) という単一のサイトのリン酸化に帰せられる。アルツハイマー様の抗体反応の多く、および次のゲルシフトはステージ 2 で始まる (約 6 時間まで)。それ以上のリン酸のとり込みとともにみられるそれ以上のシフトはステージ 3 (24 時間まで) で生ずる。しかし、微小管との結合への影響はステージ 1 のあとから完全に認めることができ。この時点で、タンパクは約 2 モルの Pi (最大約 5–6 モルのなかから) を結合する。このなかで約 1 が Ser 404 のリン酸化であり、最初のゲルシフトで同定される。他のリン酸は Ser 202, 235、および 262 間に分布するが、オートラジオグラフィーによる正確な定量およびホスホペアチドの配列決定は困難だった。

【0146】そこで、この問題にとりくむために特定部位の突然変異誘発 (site-directed mutagenesis) を行った。問題の Ser 残基を Ala (当該残基をリン酸化不能にする) または Asp (リン酸化した状態のマイナス電荷をもつ状態をつくりだす (真似る)、図 35a 参照) で置き換えた。次いで、これらの変異体をゲルシフト、リン酸のとり込み、及び微小管結合によって分析した (図 35 b)。変異 Ser 404-Ala はステージ 1 でのリン酸化能でそ

のシフトを失なうがしかし、このタンパクのリン酸化は依然として微小管結合能に対し大きな影響を与えるこれを減少させる（ストイキオメトリーの差異は $D_n=0.17$ 、即ち非変異の対照 $D_n=0.33$ の52%）。これは、残るSer 202、235、および262の一つあるいはそれ以上が、結合に対するリン酸化の効果の大きな部分に影響を与えていていることを示唆する。同様の結果がSer 202、235および396をAlaまたはAspに変異させたときにも得られ、これらの残基のいずれもが野生型のhtau 23について観察されるリン酸化後の低いストイキオメトリーを説明することはできない。しかし、Ser 262を変えたとき、微小管への結合はリン酸化によってほとんど影響を受けなかつた（ $D_n=0.04$ ）。言葉を変えると、最初の反復単位中のSer 262のただ1つの変異がタウの微小管結合のリン酸化に対する感受性をほぼ除去することができる、あるいは逆に、Ser 262のリン酸化がタウの微小管への結合を劇的に低下させる。

b MAPキナーゼはタウのアルツハイマー様の免疫反応性をひき起すが、微小管への結合をそこなわない。

【0147】a節の結合データは脳の抽出物について得られたものであるが、抽出物によるリン酸化の性質の大部分はアフリカツエガエルの卵母細胞またはブタの脳から精製したMAPキナーゼによって誘発させることができる。抽出物およびMAPキナーゼはゲルシフトを誘発し、リン酸化の時間経過は類似しており、ともに抗体に対して類似の（ステージ2のリン酸化とともに“アルツハイマー様”的反応が始まることも含め）パターンをひき起す。抽出物について見出される主なリン酸化のサイトはSer-Proモチーフにあり、このすべてはMAPキナーゼによってもリン酸化される。MAPキナーゼによってThr-Proモチーフもまたリン酸化され、精製したMAPキナーゼは脳の抽出物よりもプロリン依存のSer/Thrキナーゼとして効率がよい。最後にMAPキナーゼは脳の抽出物のなかの主なリン酸化成分である。

【0148】しかし、高度に精製したMAPキナーゼのタウの微小管の結合への影響を調べると、これは脳の抽出物（図36で $D_n=0.31$ ）に比較すると驚くほど小さい（ $D_n=0.09$ ）ことがわかった。これは上の実験と一致しており、Ser-ProまたはThr-Proモチーフのリン酸化それ自体は微小管の結合に関して単なる二義的な重要さしか持たないことを示唆している。

【0149】これはhtau 23から出発した2つの“全”変異体、AP17およびAP18を用いて検証された（図37a）。AP18はAP17と似ているが、Ser 262および356（抽出物のリン酸化で以前に見つかった、Proがその後に続かない2つのセリン）がさらにAlaに変えられた。MAPキナーゼが野生型のhtau 23のすべてのSer-ProおよびThr-Proサイトをリン酸化する（典型的にはhtau 23あたり最大10-12モルのPi）一方、AP17のとり込みはせいぜい1.4Piであり、MAPキナーゼがSer-

ProまたはThr-Proに対して高い特異性をもつことを示している。MAPキナーゼによるリン酸化とは無関係に、AP17は、リン酸化されていない野生型のhtau 23と同様のパラメーターをもって微小管をかたく結合する。同じ結果がAP18とMAPキナーゼを用いて得られる（Piのとり込み1未満）。

【0150】しかしながら、AP17およびAP18を脳抽出物の活性でリン酸化した場合には、2つの変異体は劇的な違いをみせる（図37b）。AP18のとり込みは約0.5Piで、リン酸化に際してタウの微小管への結合のストイキオメトリーの低下はほんの僅かである（ $D_n=0.01$ ）。AP17のとり込みは約1.3Piであり、しかもリン酸化に際してのタウの微小管への結合の低下は野生型htau 23のものと同じである（ $D_n=0.31$ ）。

【0151】これらの結果は、脳抽出物がMAPキナーゼとはちがう、タウタンパクの最初の反復単位のなかのSer 262をリン酸化するあるリン酸化成分をもつように見えること、またリン酸化をうけると、このただ一つのセリンがタウと微小管の相互作用に劇的な影響を及ぼすことは明らかである。これとは対照的に、MAPキナーゼは、ゲルシフトおよび免疫反応という、タウのアルツハイマー状態の他の指標に影響を与える。

c 脳の35kDaおよび70kDaキナーゼはSer 262のリン酸化によって微小管結合を低下させる。

【0152】Ser 262の周辺の配列は既知のキナーゼの明らかなコンセンサスモチーフと一致せず、既知のキナーゼを調べることはあまり意味がないように思われた。その代り、脳の抽出物からキナーゼを精製した。活性分画をタウのリン酸化および微小管結合への影響を基準に同定した。

【0153】最初のステップはMono Qのイオン交換クロマトグラフィー（図38a）であり、キナーゼ活性の最もな3ピークが得られた。微小管の結合に最大の影響を与えるフラクションをさらにゲルクロマトグラフィーにかけた（図38b）。おもな活性分画はMrが35kDaのあたりに溶出された。この分画をさらにもう一度イオンクロマトグラフィーにかけた。このタンパクはMono Sには結合せず、酸性のpIをもつことが示唆されるが、Mono Q上、一つの大きなピークとして溶出される（図38c）。フラクション9の銀染色ゲルは、>95%の純度の35kDaのバンドと、41kDaあたり（図38d、レーン5）のマイナーバンド（<5%）を示す。他のフラクションはもう一つのバンドを45kDaあたりに持つが、これはキナーゼ活性を持たなかった（下を見よ）。

【0154】ゲル内のどのバンドがタウをリン酸化する能力があるかを直接に決めるために、Geahlen et al., Anal. Biochem. 150(1986), 151-158の方法に従ってゲル内アッセイを行った。タウタンパクをゲルマトリックス内に重合させ、Mono QフラクションをSDS電気泳動によってこのゲル上で分離した。結合したタンパクはゲ

ル内で復元させ、放射性のATPとインキュベートし、活性をオートラジオグラフィーでアッセイした。図39は35kDa1および41kDa1バンドはキナーゼ活性をもつが45kDa1バンドはもたないことを示す。

【0155】キナーゼによるタウコンストラクトへのリン酸のとり込み量の定量によって次のような結果が得られた。htau 34では3.2Pi、htau 40では3.4、htau 23では3.3であるが、変異体htau 23(Ser 262 → Ala)では2.8だけだった。全変異体AP17へのとり込みは3.0Piであり、Ser-ProまたはThr-Proモチーフはキナーゼの標的ではなく、3反復単位コンストラクトK18は1.4Piをとり込んだ。

【0156】キナーゼでリン酸化されたタウはSDSゲル中で上方にシフトする。図40aはキナーゼによるタウの異なるゲルシフトを比較したものである。35kDa1キナーゼによるシフトは、PKA(レーン10)によるものと同様に中間の大きさで(レーン2)、CaMキナーゼ(レーン9)のものより大きいが、アルツハイマー様の免疫反応をひき起こすMAPキナーゼ(レーン11)のものよりは明らかに小さい。変異体Ser 409-Ala(レーン3, 4)はリン酸化によってシフトしないが、他の変異体(たとえばSer 416、レーン5, 6またはSer 404レーン7, 8)はシフトし、セリン409が35kDa1キナーゼによるリン酸化によってシフトを生ずる残基があることを示している。この同じシフトがSer 409をもリン酸化するPKA(レーン10)についてもみられる。反復領域内のリン酸化がシフトを生じさせないので、これらのデータはシフトサイト(大部分がC-末端末尾にある)は微小管の結合を制御しているサイト(たとえばSer 262)とははっきり別のサイトであることを確認するものである。

【0157】精製したキナーゼのタウの結合に対する影響(図40b)は脳の抽出物のそれ(図37b)に似ている。たとえばhtau 23のストイキオメトリーはリン酸化に際してDn=0.28だけ低下するが、点変異体Ser 262-A1aでは0.05だけであり、ふたたびSer 262の重要性が強*。

*調される。

【0158】第一の微小管結合反復単位と微小管結合に重要であるSer 262を拡大強調したhtau 40の図式を図41に示す。

【0159】タウが70kDa1キナーゼによってリン酸化された場合にも、タウの微小管への結合に対して同様の影響が観察される(図45参照)。このキナーゼは約3-4Piをタウの反復領域中のSer 262, 293, 324, 356に特異的にとり込む。これは次のステップに従って調製され

10 10. a脳抽出物の高速遠心の上清を得る。bQ-セファロースのクロマトグラフィー。c非吸着分画(flowthrough)のS-セファロースによるクロマトグラフィー。キナーゼ活性は250mM NaClで溶出される。dヘパリンアガロースのクロマトグラフィー。キナーゼ活性は250mM NaClで溶出される。eゲルろ過。キナーゼ活性は70kDaで溶出。f Mono Qのクロマトグラフィー。キナーゼ活性は150mM NaClで溶出する。

実施例12 ホスファターゼPP2aおよびPP1によるタウタンパクの脱リン酸化

20 20. htau 40を本明細書を通して述べられた方法に従って、ブタMAPキナーゼ(p42)および³²P-ATPを用いてリン酸化した。続いてhtau 40をいくつかのイソフォームのPP2a(図42AからCまで)およびPP1(図42D)によって脱リン酸化した。htau 40はすべてのイソフォームのPP2aおよび、よりゆっくりとではあるがPP1によっても脱リン酸化される。図43は脱リン酸化に伴って抗体特異的なエピトープも消失することを示す。図44では脱リン酸化の時間経過およびミカエリスメンテン図を示した。

30 30. 【0160】このようにPP2aおよびPP1はMAPキナーゼのアンタゴニストとして働くので、アルツハイマー病の治療のための薬剤組成として用いることができるであろう。

【0161】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FORDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
<120> Novel Tools for the Diagnosis and Treatment of
Alzheimer's disease
<130> PA99-177
<150> EP 91 12 0974.0
<151> 1991-12-06
<150> EP 92 11 9551.7
<151> 1992-11-16
<160> 33
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 6
<212> PRT

65
<213> Homo sapiens
<400> 1

Lys Glu Ser Pro Leu Gln

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro

1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Pro Gly Ser Pro Gly Thr

1 5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser

1 5 10

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Pro Lys Ser Pro Ser Ser

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser

1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

67
<400>.8
Met Val Asp Ser Pro Gln Leu
1 5
<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9
Pro Leu Gln Thr Pro Thr Glu
1 5
<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Leu Lys Glu Ser Pro Leu Gln Thr Pro Thr Glu Asp
1 5 10
<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 11
Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala
1 5
<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12
Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu
1 5
<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
1 5
<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14
Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala
1 5
<210> 15
<211> 7
<212> PRT

69

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser

1 5

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Val Val Arg Thr Pro Pro Lys

1 5

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

71

<400> 22

Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala

1

5

10

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys

1

5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys

1

5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His

1

5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His

1

5

10

<210> 27

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr

1

5

10

15

Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu Gln

20

25

<210> 28<211> 19<212> PRT<213> Homo sapiens<400> 2* *8

Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro

1

5

10

15

Gly Ser Arg

<210> 29<211> 10<212> PRT<213> Homo sapiens<400> 2* *9

Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys

1

5

10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

72

73

74

<213> Homo sapiens
<400> 30
Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg

1 5 10

<210> 31
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 31

Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly

1 5 10 15

Asp Thr Ser Pro Arg
20

<210> 32
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 32

His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser

1 5 10 15

Pro Gln Leu Ala Thr Leu

20

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 33

Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu

1 5

【図面の簡単な説明】

【図1】タウのアミノ酸配列（イソフォームhtau40、Goedertら、1989）（1a）、タウイソフォームのSDSゲル（1b(a)）、及びAT8抗体を用いたイムノプロット（1b(b)）を示す図である。

【図2】細菌によって発現させたヒトタウの、脳のキナーゼを用いたリン酸化を示す図である。

【図3】構築体K3M、K10、K19及びK17を示す図である。

【図4】htau40ならびに構築体K10、K17、K3MおよびK19のリン酸化を示す図である。

【図5】トリプシンペプチドS195-R209を示す図である。

【図6】htau23のD-変異体（S199とS202をアスパルギン酸（D）に変えたもの）のリン酸化及び抗体応を示す図である。

【図7】細菌によって発現させたヒトイソフォームhtau23の脳キナーゼ活性によるリン酸化の経時変化、ならびに対応オートラジオグラムを示す図である。

【図8】htau23のリン酸化の経時変化を示すSD*50

* Sゲル（a）、及びそのイムノプロット（b）を示す図である。

【図9】リン酸化前および後のタウイソフォームの微小管への結合を示す図である。

【図10】htau40の図であって、キナーゼ活性によりリン酸化された7個のSer-Proモチーフの位置を示すものである。

【図11】htau34のリン酸化前（丸印）および90分間リン酸化後（三角印）の微小管への結合を示す図である。

【図12】アルツハイマー患者および正常なヒトの脳のタウタンパク質のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、ならびに抗体SMI33、SMI31およびSMI34を用いたそれらのイムノプロットを示す図である。

【図13】細菌によって発現させたヒトイソフォームhtau23のリン酸化の経時変化、ならびに抗体SMI33、SMI31、SMI34、TAU1およびAT8を用いたイムノプロットを示す図である。

【図14】タウおよび構築体のSDSゲル、ならびに抗体SMI33、SMI31およびSMI34を用いたイ

ムノプロットを示す図である。

【図15】htau40およびhtau23の点変異体を示す図である。

【図16】htau40および図15に示されたその点変異体のSDSゲル、ならびに抗体SMI33、SMI31およびSMI34を用いたイムノプロットを示す図である。

【図17】タウの欠失変異体およびそれらの抗体応答を示す図である。

【図18】htau40と本研究に使用した種々の変異体を示す図である。

【図19】タウの二量体化ならびにオリゴマー化の研究に使用されたタウイソフォームおよび構築物を示す図である。

【図20】タウ構築体および架橋生成物のSDSポリアクリルアミド電気泳動(4-20%)ならびにゲルクロマトグラフィーを示す図である。

【図21】構築体K12から合成した対らせん状フィラメントを示す図である。

【図22】PDMで架橋したK12二量体から合成し、1%リンタングステン酸でネガティブ染色した対らせん状フィラメントを示す図である。

【図23】アルツハイマー患者脳の対らせん状フィラメントを示す図である。

【図24】グリセロール吹き付け及び金属影つけによって調製したタウイソフォームhtau23および構築体T8R-1の電子顕微鏡写真である。

【図25】タウ構築体および二量体の長さを示す棒グラフである。

【図26】構築体K11およびK12の電子顕微鏡写真である。

【図27】PDMで架橋したK12二量体(a)、及びMBSで架橋したK12単量体(b)を示す図である。

【図28】htau23、K12およびこれらの架橋生成物の抗体標識を示す図である。

【図29】htau40のGSK3によるリン酸化の経過、ならびに免疫応答を示す図である。

【図30】GSK3を用いたリン酸化による移動度シフト: htau23とその変異体/A404の比較を示す図である。

【図31】タウ構築物を示す図である。

【図32】MAPキナーゼおよびGSK3とブタ脳微小管との共重合を示す図である。

【図33】正常な脳抽出物およびアルツハイマー脳抽出物におけるGSK3 α および β の同定を示す図である。

【図34】htau23の微小管(20 μ Mタキソールの存在下で10 μ Mチューブリンより作製した)への結合曲線を示す図である。

10 【図35】この発明に使用したhtau23とその点変異体(a)、及びhtau23とその点変異体の、未リシン酸化状態および脳抽出物によりリシン酸化された状態での、微小管への結合曲線(b)を示す図である。

【図36】htau40の微小管への結合曲線を示す図である。

【図37】全変異体AP18を示す図(a)、ならびにhtau23および「全」変異体AP17およびAP18の、脳抽出物によってリシン酸化されていない、またはされた状態での、微小管への結合曲線を示す図(b)である。

20 【図38】クロマトグラフ法によるブタ脳由来キナーゼの調製を示す図である。

【図39】キナーゼ活性のSDSゲルおよびゲル内アッセイを示す図である。

【図40】35kDa1キナーゼによるタウのリシン酸化がゲル変化ならびに微小管結合に及ぼす影響を示す図である。

【図41】htau40を示す図である。

【図42】 32 Pで標識したhtau40(「ht40 32 P」)の異なるPPasesを用いた脱リシン酸化を示す図である。

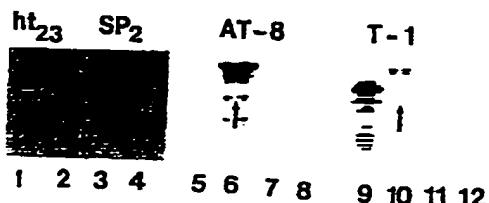
【図43】PP2a-Hによる脱リシン酸化: リン酸化依存性抗体の抗原決定基の消失を示す図である。

【図44】PP2a-Hによる脱リシン酸化の速度論を示す図である。

【図45】タウタンパク質の2個のIGSモチーフおよび2個のCGSモチーフ(セリン262、293、324、409)をリシン酸化する70kDa1キナーゼの調製を示す図である。

40 【図46】cdk2/サイクリンAによるhtau40のリシン酸化の経時変化を示す図である。

【図6】



[図1]

250 260 270
 QTAPVPHPDKNVKSKIGSTENLICHHPGGK
 280 290 300
 VGIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGS
 310 320 330
 VOIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGO
 340 350 360
 VEVKSEXLDFKDRQSKIGSLDNITHVPGGGN
 370 380 390 400
 KKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYSPVSGDTPR
 410 420 430 440
 HILSNSSTGSIDHVDSPOLATLAEVASALKOL

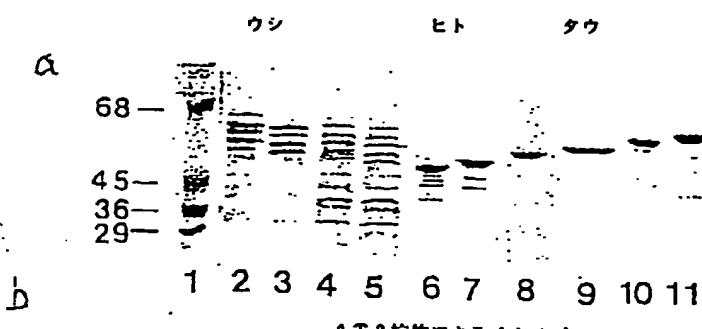
1

〔図12〕

【图14】

K₁₀ K₁₇ K₁₉ c — SMI-34
b SMI-33 d — SMI-31

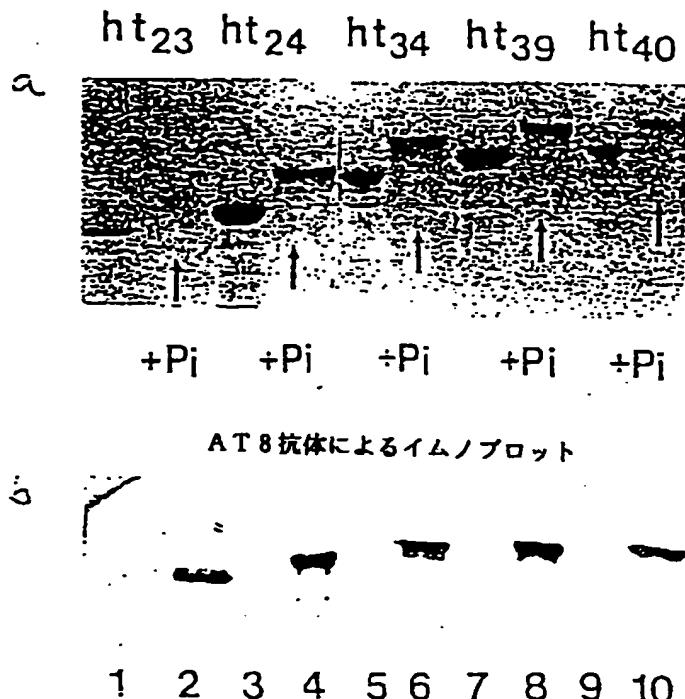
〔图30〕



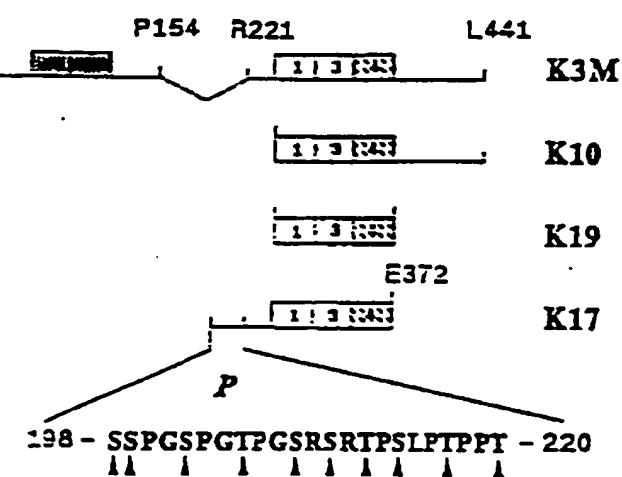
1b



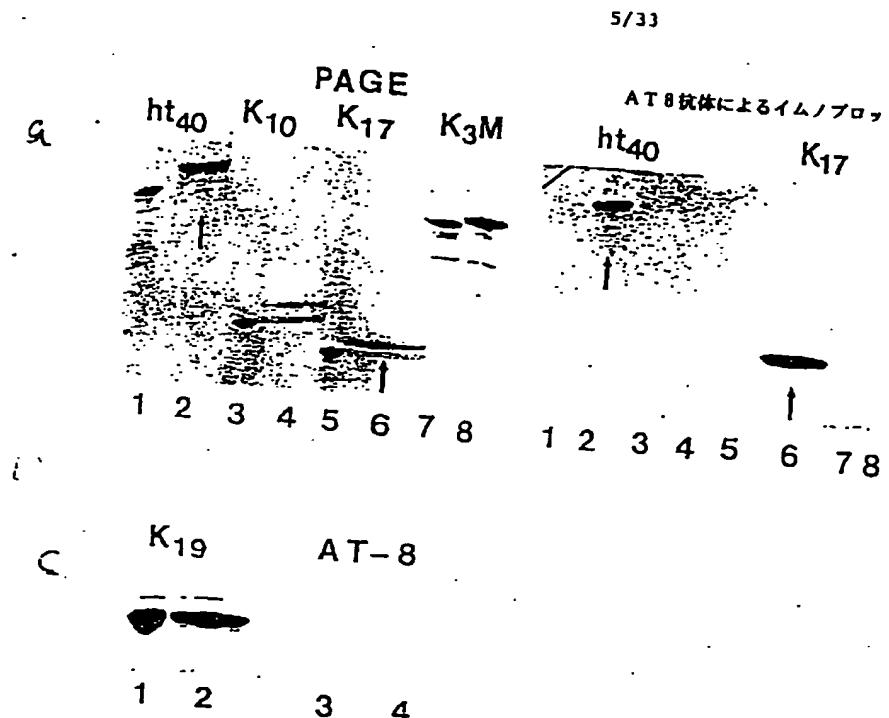
【図2】



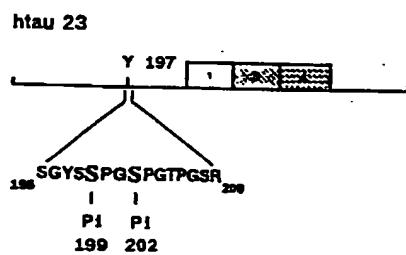
【図3】



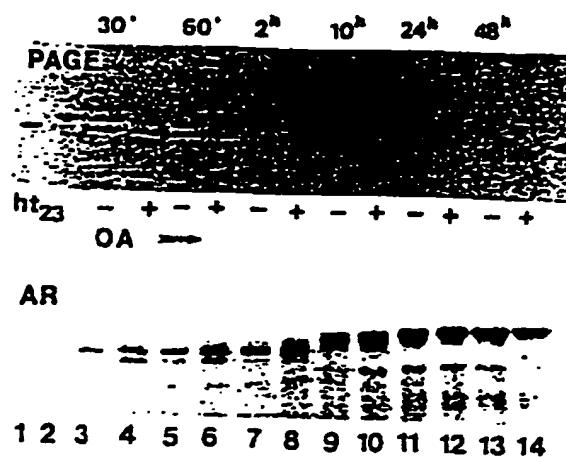
【図4】



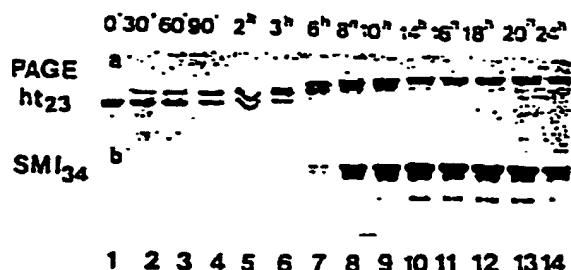
【図5】



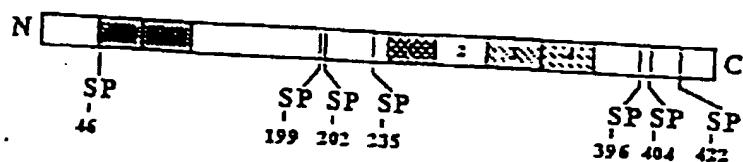
【図7】



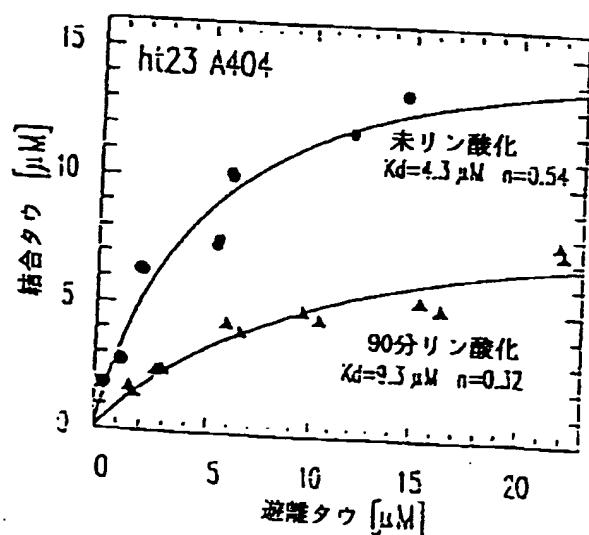
【図8】



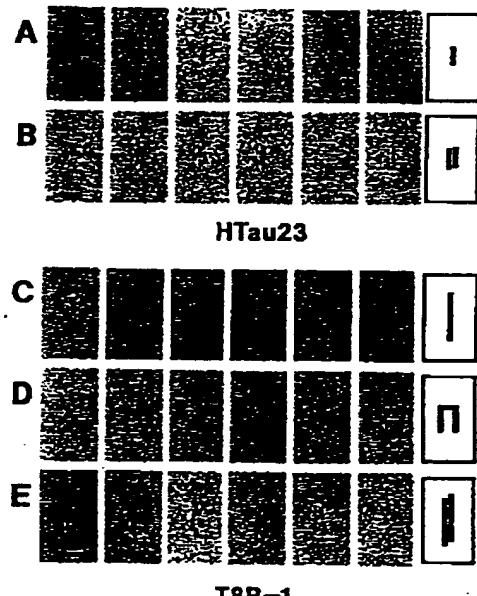
【図10】



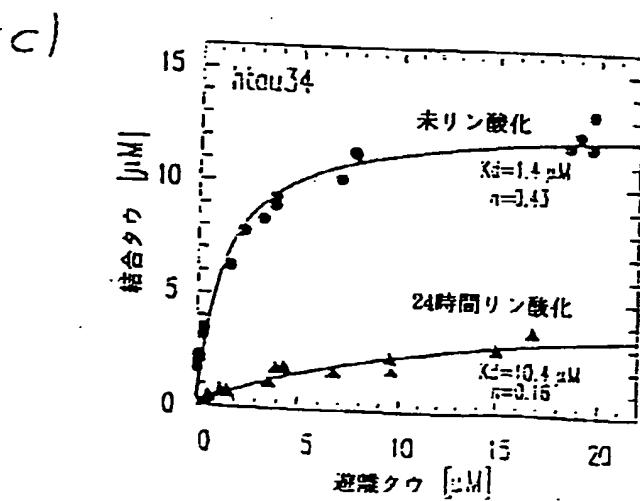
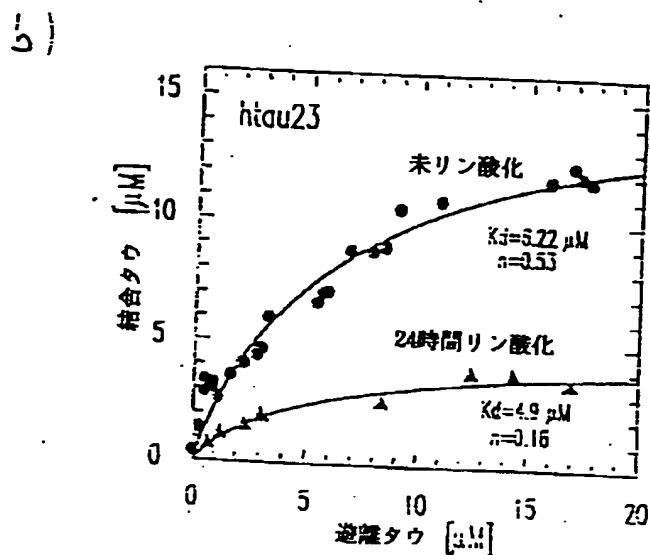
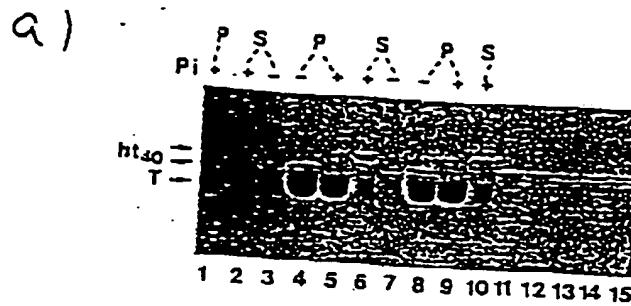
【図11】



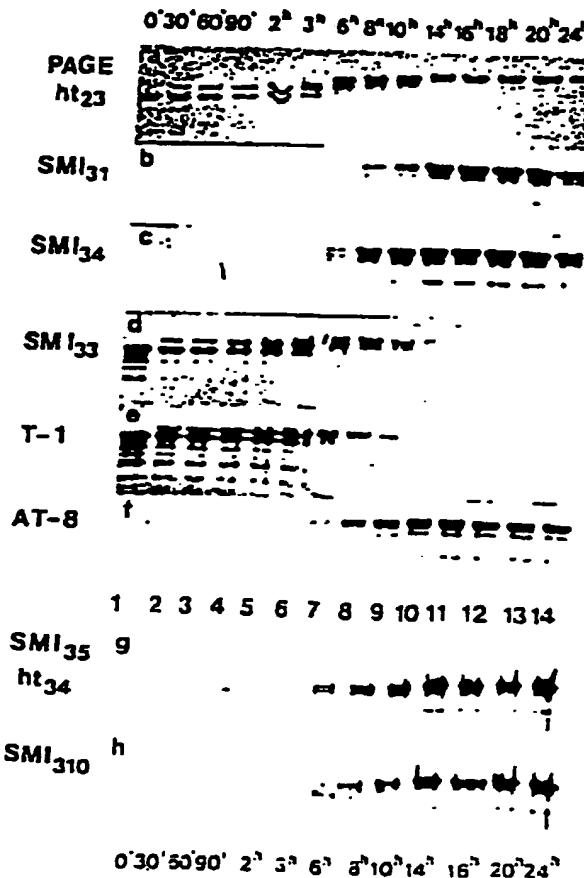
【図24】



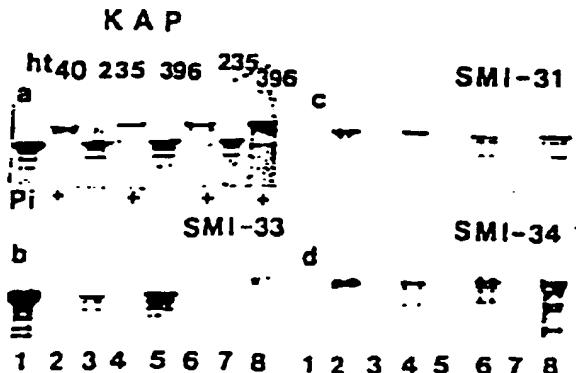
【図9】



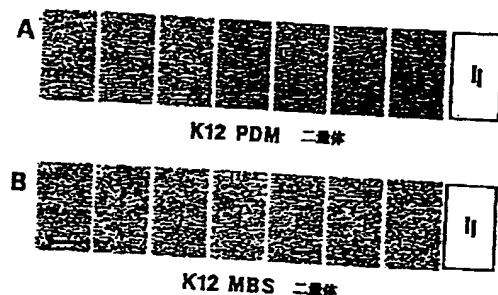
【图13】



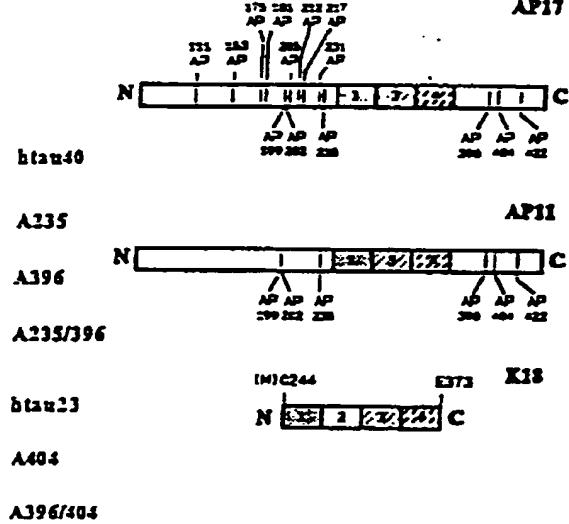
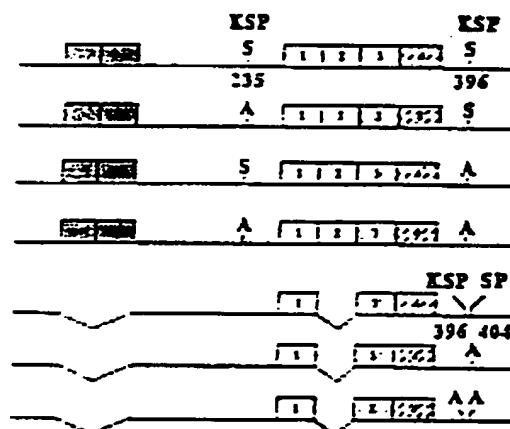
【图16】



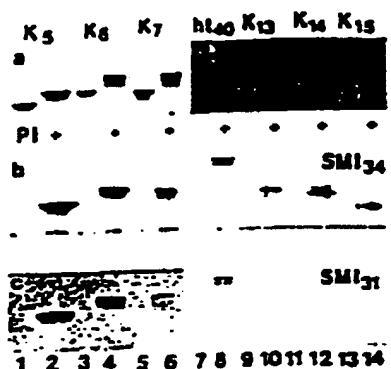
[图27]



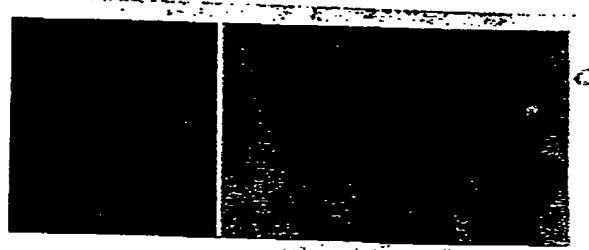
【图15】



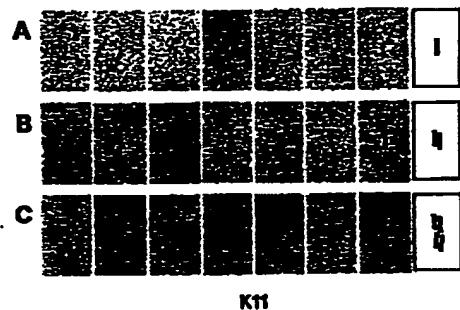
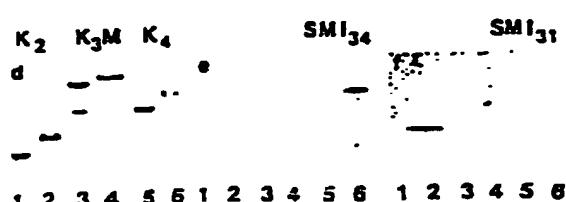
【図17】



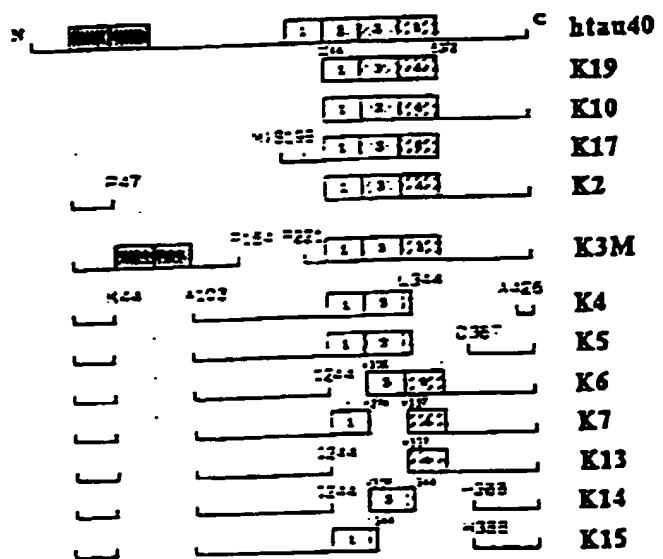
【図23】



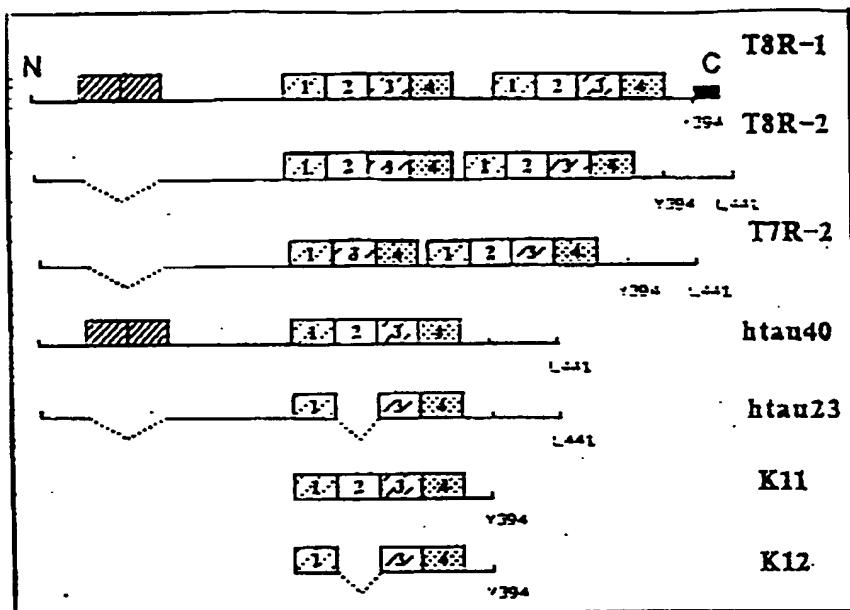
【図26】



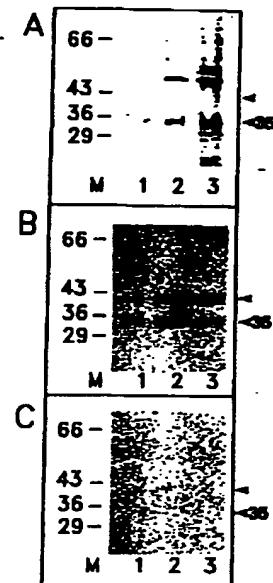
【図18】



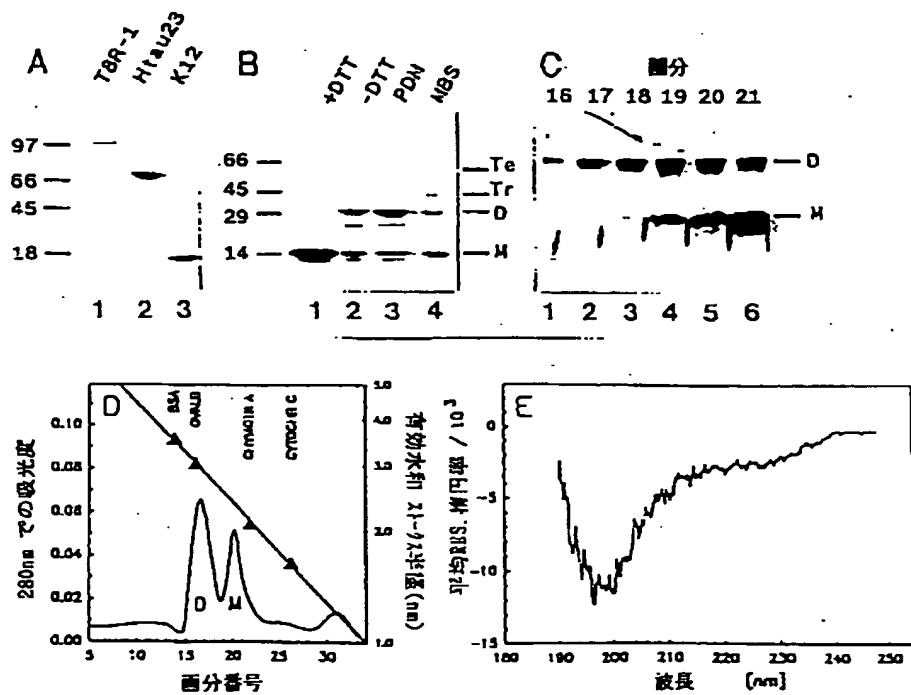
【図19】



【図39】



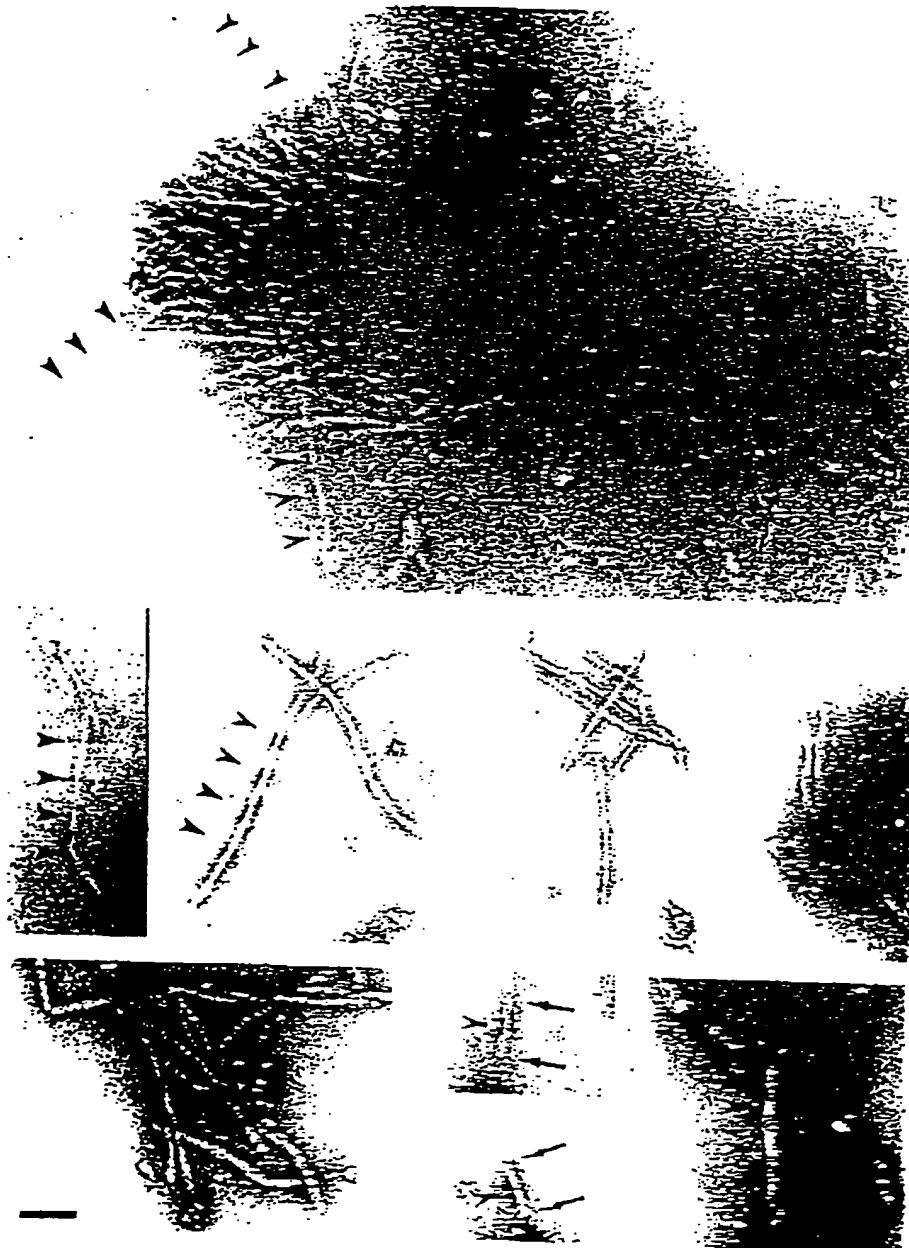
【図20】



【図21】

A

K12由來PHF

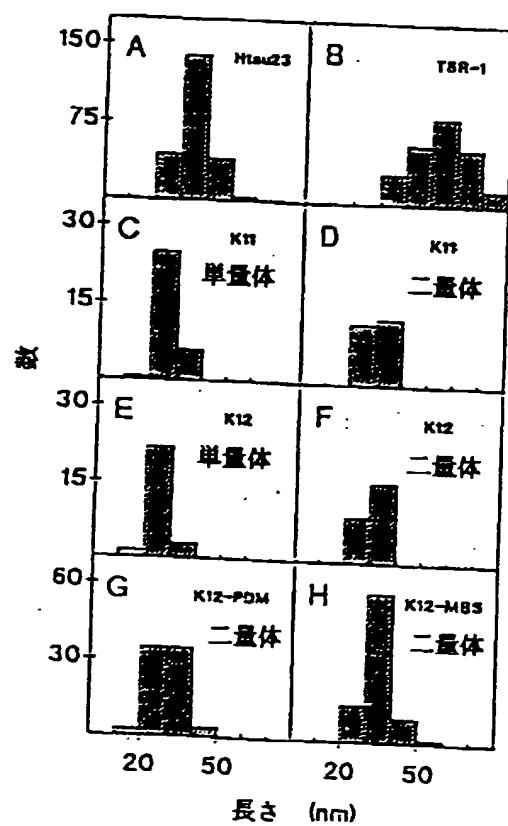


【図22】

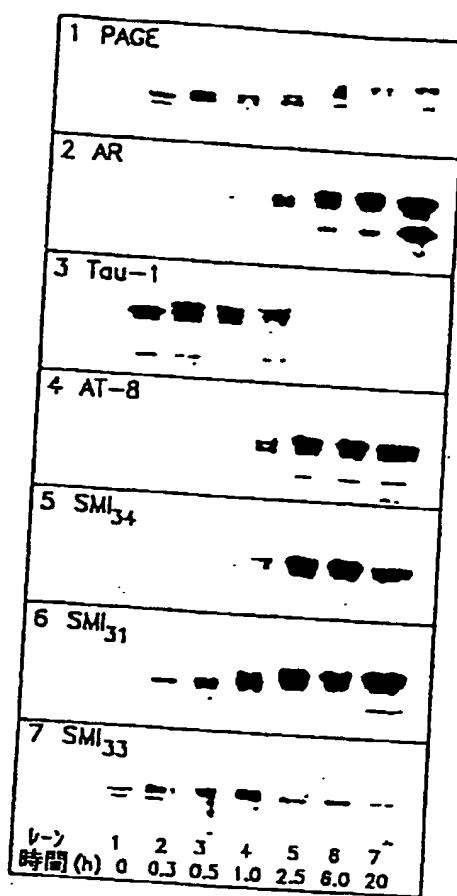


K12-PDM二量体由来PHF

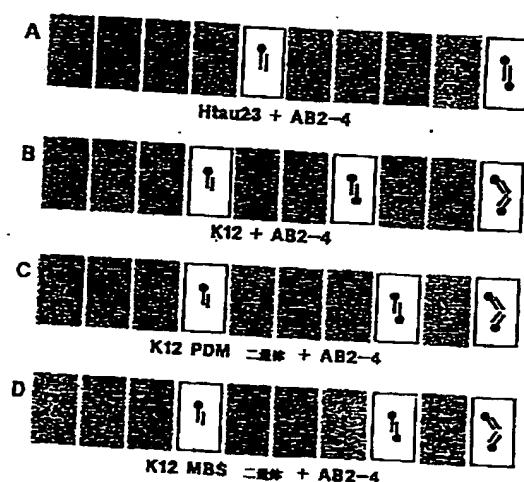
【図25】



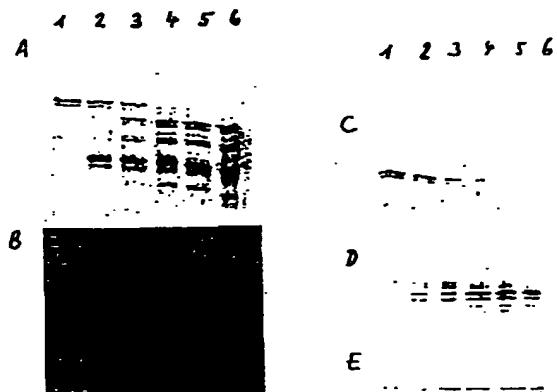
【図29】



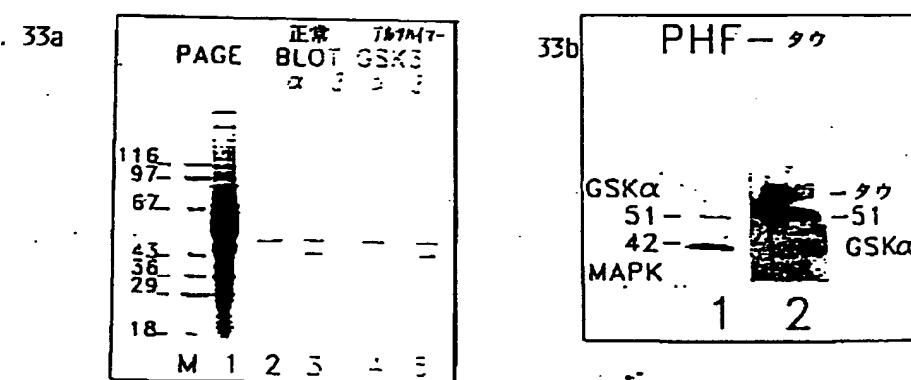
【図28】



【図43】



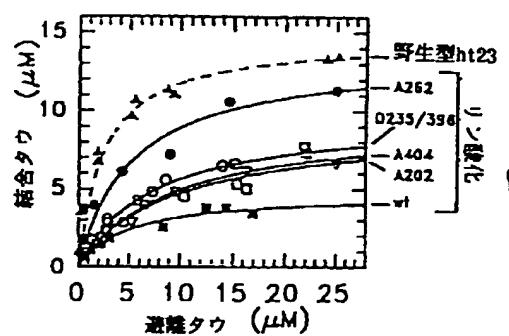
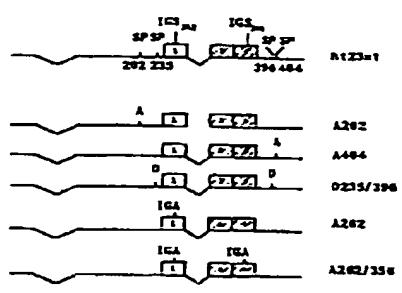
【図33】



【図35】

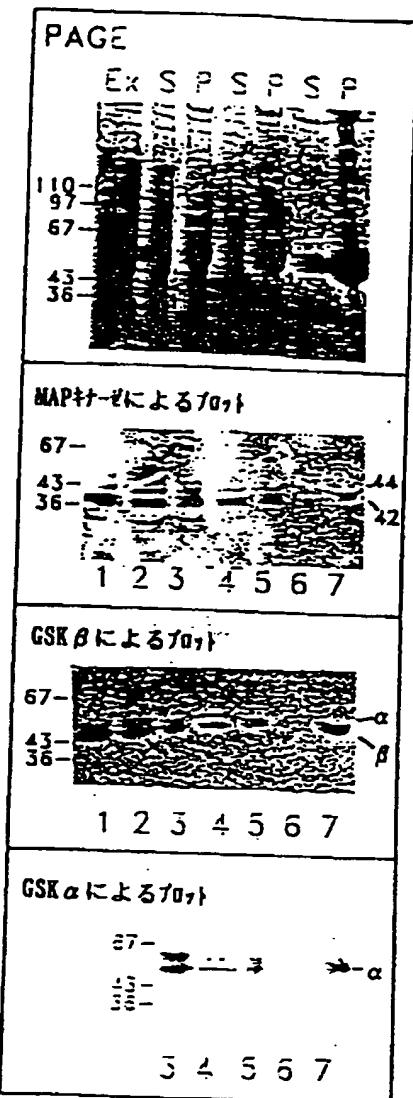
35a

35b



【図32】

32a



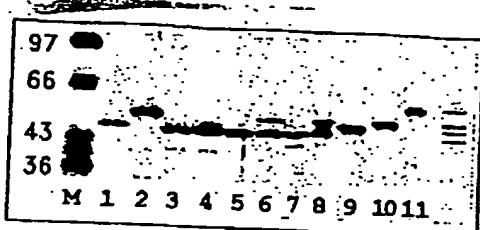
32b

32c

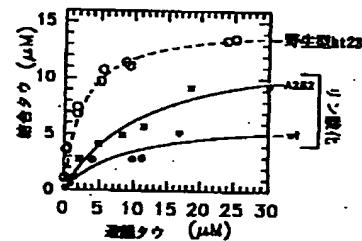
32d

【図40】

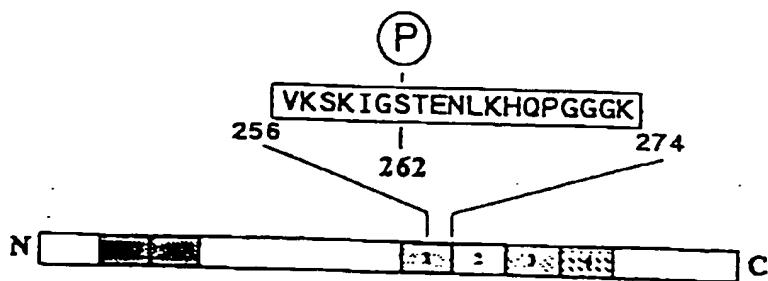
40a



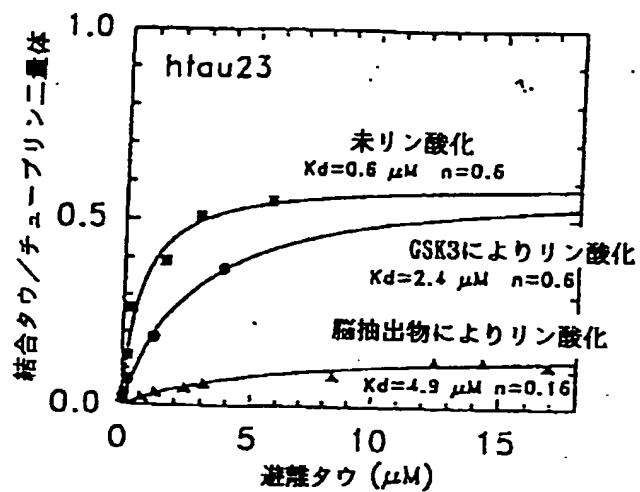
40b



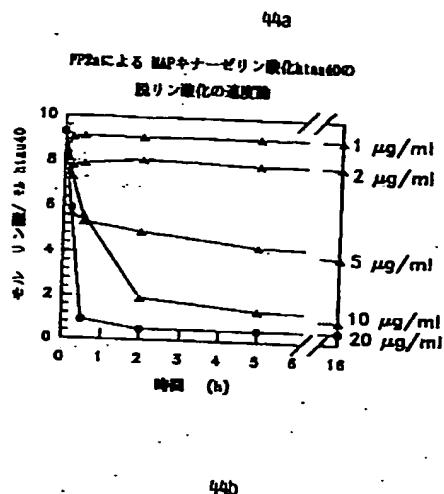
【図41】



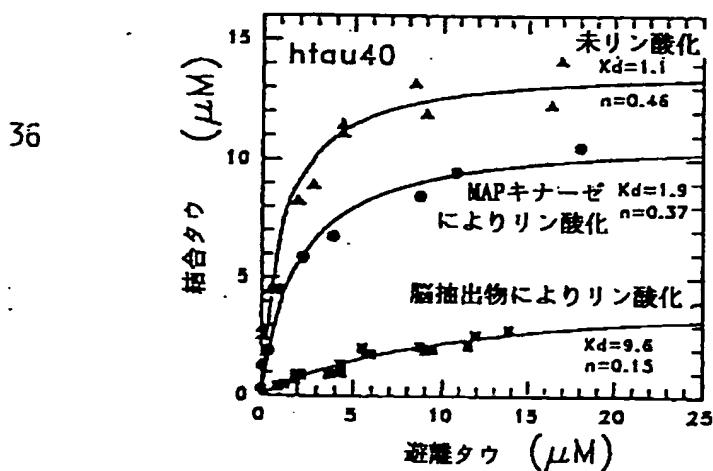
【図34】



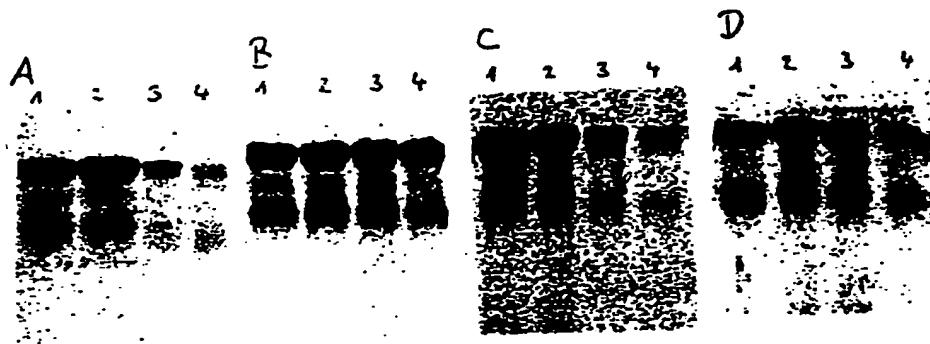
【図44】



【図36】

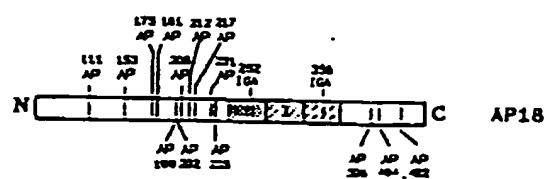


【図42】

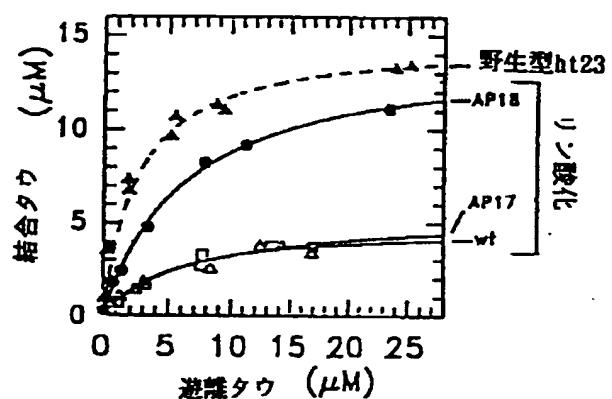


【図37】

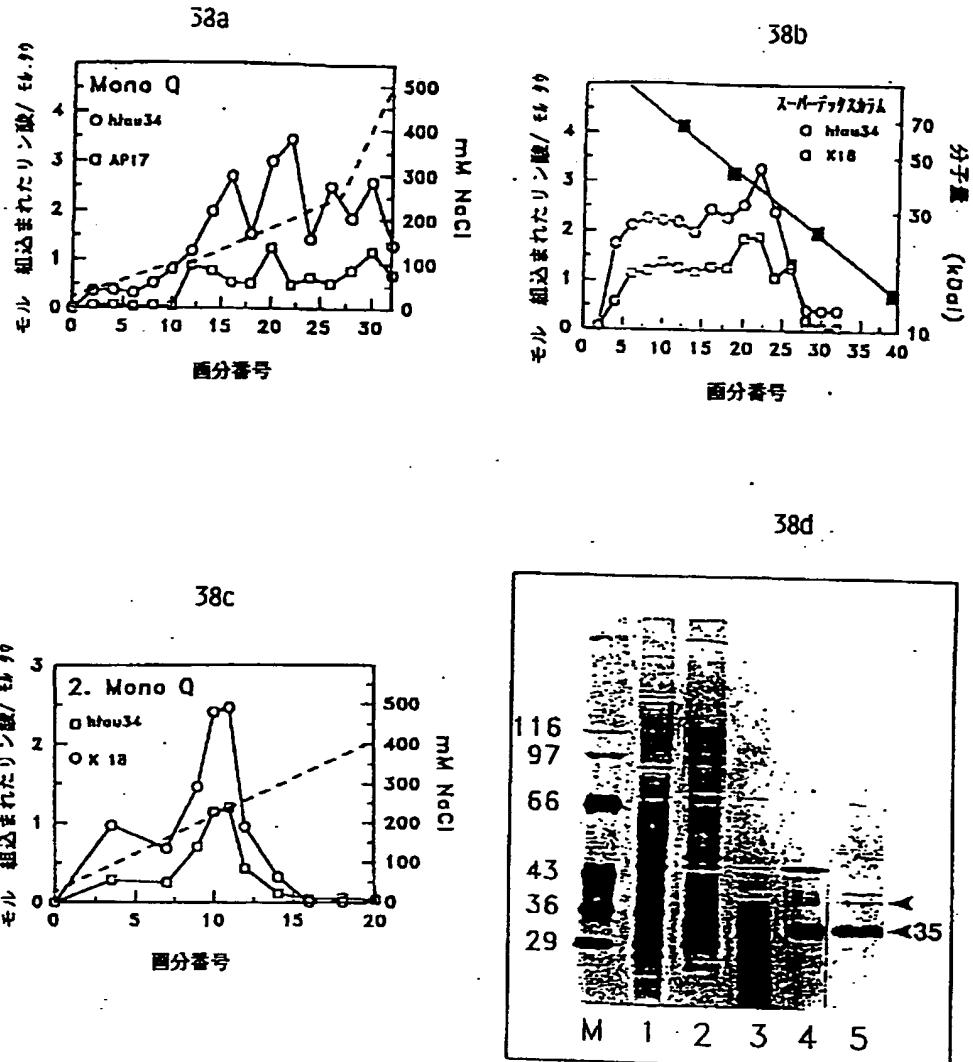
37a



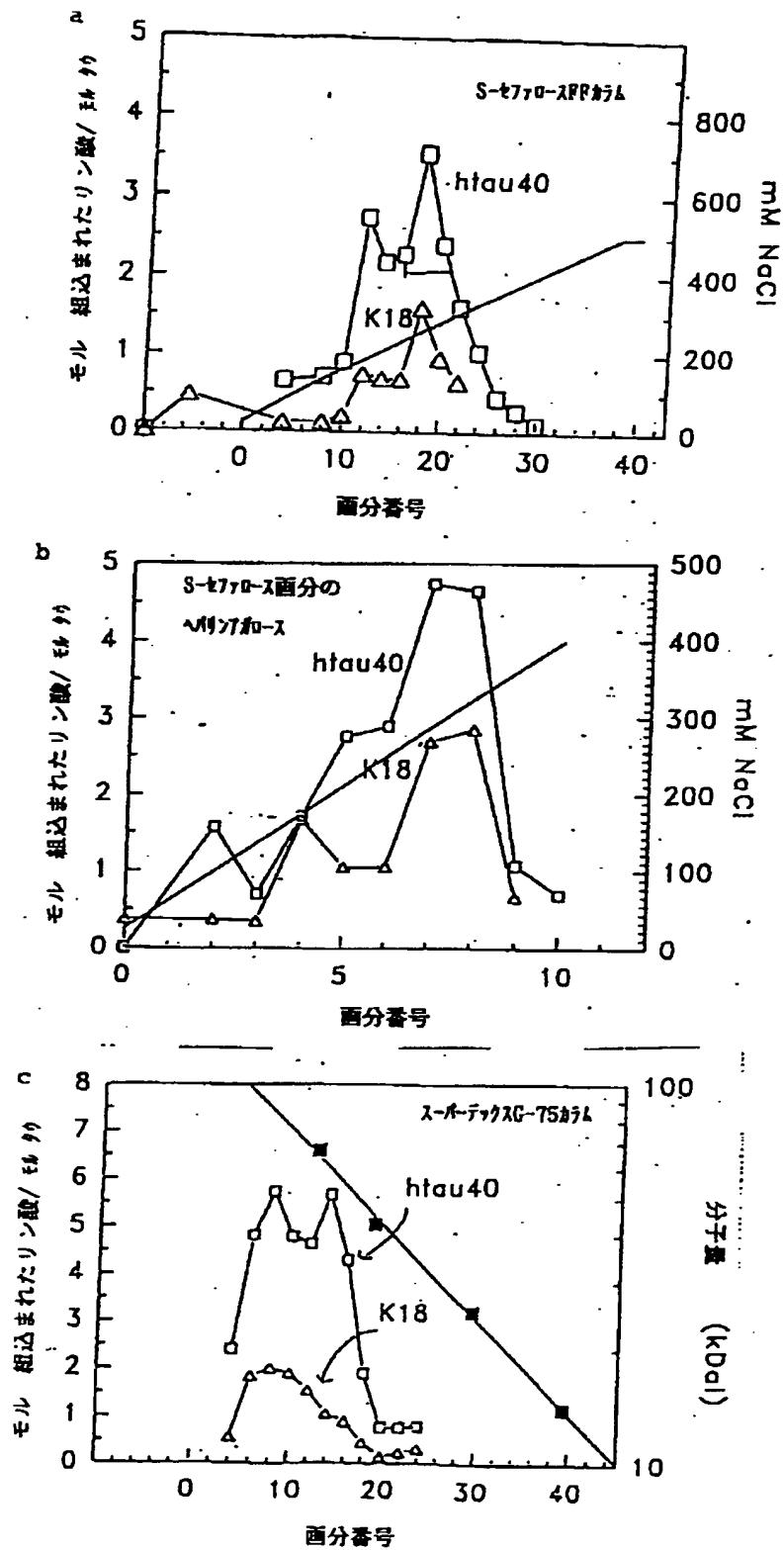
37b



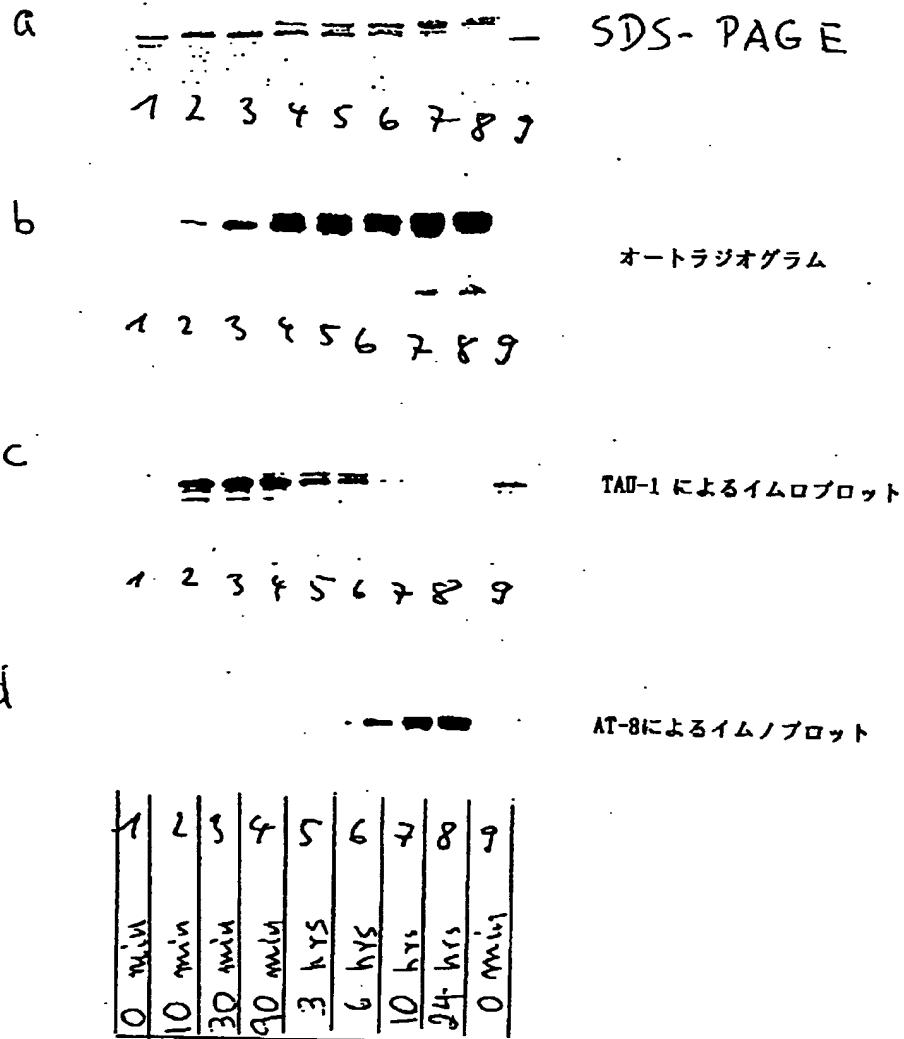
【図38】



【図45】



【図46】



【手続補正書】

【提出日】平成11年10月15日(1999.10.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項2

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項2】 アルツハイマー病のin vitro診断および
または監視法であって、患者の脳脊髄液単離物を検定
するか、または神経組織の生検を実施し、そしてリン酸
化されたアルツハイマータウタンパク質の存在について
該組織を調べることからなる方法。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	マーコド(参考)
)			
C 07 K 14/47		C 12 N 9/12	
C 12 N 9/12		C 12 P 21/02	Z N A C
C 12 P 21/02	Z N A	C 12 Q 1/68	A
C 12 Q 1/68		G 01 N 33/50	Z
G 01 N 33/50		33/53	D
33/53		33/573	A
33/573		A 61 K 31/00	6 2 6 N
// A 61 K 31/00	6 2 6	C 12 P 21/08	
38/46		A 61 K 37/52	
C 12 P 21/08		37/54	
(C 12 N 9/12			
C 12 R 1:19)			
(72)発明者 マンデルコー, エクハルト		(72)発明者 ピルナット, ジャセク	
ドイツ連邦共和国 2000 ハンブルグ 52		ドイツ連邦共和国 2000 ハンブルグ 11	
バロン-ヴォート-シュトラーセ 212		ツォーハオシュトラーセ 12	
エイ.		(72)発明者 ドレヴェス, ゲラルド	
(72)発明者 リヒテンベルク-カラーカ, ビルギット		ドイツ連邦共和国 2000 ハンブルグ 36	
ドイツ連邦共和国 1000 ベルリン 65		ケーエル, シェーフェルカンプ 40	
ウェディングシュトラーセ 5		(72)発明者 スタイナー, バーバラ	
		ドイツ連邦共和国 2000 シェネフェルト	
		パークグルンド 12	